

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IZABELLE BALBI JARDIM

**Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de
apresentações gestacionais**

Pirassununga

2016

IZABELLE BALBI JARDIM

Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de apresentações gestacionais

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Departamento: Medicina Veterinária

Área de concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

J37e Jardim, Izabelle Balbi
Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de apresentações gestacionais / Izabelle Balbi Jardim ; orientador Luciano Andrade Silva. -- Pirassununga, 2016. 58 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Gestação bovinos. 2. Fenótipos gestacionais. 3. Clone bovino. 4. Perdas gestacionais. 5. Ultrassonografia Doppler. I. Silva, Luciano Andrade, orient. II. Título.

IZABELLE BALBI JARDIM

Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de apresentações gestacionais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Data da aprovação: 15/04/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva (Orientador)

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP)

Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP)

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP)

TREM DA VIDA

“Nossa vida é como uma viagem de trem, cheia de embarques e desembarques, de pequenos acidentes pelo caminho, de surpresas agradáveis com alguns embarques e de tristezas com os desembarques...

Quando nascemos, ao embarcarmos nesse trem, encontramos duas pessoas que, acreditamos, farão conosco a viagem até o fim:
Nossos pais. Não é verdade?

Infelizmente, em alguma estação eles desembarcam, deixando-nos órfãos de seus carinhos, proteção, amor e afeto.

Mas isso não impede que durante a viagem outras pessoas especiais embarquem para seguir viagem conosco:
são nossos irmãos, amigos, amores.

Muitas pessoas tomam esse trem a passeio.
Outros fazem a viagem experimentando somente tristezas.
E no trem há, também, pessoas que passam de vagão a vagão, prontas para ajudar a quem precisa. Muitos descem e deixam saudades eternas. Outros tantos viajam no trem de tal forma que, quando desocupam seus assentos, ninguém sequer percebe.

Curioso é considerar que alguns passageiros que nos são tão caros, acomodam-se em vagões diferentes do nosso.
Isso nos obriga a fazer essa viagem separados deles.
Mas claro que isso não nos impede de, com grande dificuldade, atravessarmos nosso vagão e chegarmos até eles.
O difícil é aceitarmos que não podemos nos assentar ao seu lado, pois outra pessoa estará ocupando esse lugar.

Essa viagem é assim:

cheia de atropelos, sonhos, fantasias, esperas, embarques e desembarques.

Sabemos que esse trem jamais volta.

Façamos, então, essa viagem, da melhor maneira possível, tentando manter um bom relacionamento com todos os passageiros, procurando em cada um deles o que tem de melhor, lembrando sempre que, em algum momento do trajeto, poderão fraquejar e, provavelmente, precisaremos entender isso.

Nós mesmos fraquejamos algumas vezes.

E, certamente, alguém nos entenderá.

O grande mistério, afinal, é que não sabemos em qual parada desceremos.

E fico pensando:

quando eu descer desse trem sentirei saudades? Sim.

Deixar meu filho viajando nele sozinho será muito triste. Separar-me de alguns amigos que nele fiz, do amor da minha vida, será para mim dolorido.

Mas me agarro na esperança de que, em algum momento, estarei na estação principal, e terei a emoção de vê-los chegar com sua bagagem, que não tinham quando desembarcaram.

E o que me deixará feliz é saber que, de alguma forma, posso ter colaborado para que ela tenha crescido e se tornado valiosa.

Eu gostaria que você pensasse no desembarque do trem, não só como a representação da morte, mas, também, como o término de uma história.

Agradeço a Deus por você fazer parte da minha viagem, e por mais que nossos assentos não estejam lado a lado, com certeza, o vagão é o mesmo.”

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar viva e por todos como minha família e que amo e que me deu a oportunidade de conviver, minha família e meus amigos. Ou colocou na minha vida de alguma forma, como a oportunidade de amar, crescer espiritualmente, aprender e de viver.

Ao Professor Luciano, obrigada por abrir as portas para mim me dando a oportunidade de estar aqui, de aprender com ele não só conhecimentos técnicos ou escrita científica mas aprender a lidar de forma tranquila com as pessoas e com adversidades, me mostrando que, para a maioria dos problemas, há uma solução. Obrigada pela atenção ao me escutar, por me passar tranquilidade em todos os momentos do mestrado, principalmente na forma de falar, incentivar e ser sempre muito otimista e positivo.

Ao meu Pai agradeço pela inspiração de vida. Você é meu herói e minha inspiração para tudo. Pela sua forma carinhosa de falar e agir com qualquer pessoa, tratando todos da mesma forma o admiro tanto. Desde pequenas sempre ensinou a mim e minhas irmãs que ninguém é melhor do que ninguém. Obrigada por isso.

Ensinou-nos, de uma forma maravilhosa, que temos que sonhar, e que nada adianta a vida se não tivermos nossos sonhos. Nada seremos e nada iremos conquistar se tivermos apenas os pés no chão e não sonharmos. Obrigada também por isso.

No seu aniversário a Ma te mandou essa mensagem e ela traduz o que sentimos por você: “Antes de mais nada quero que saiba que para mim é um orgulho te chamar de pai. Toda a minha vida tenho olhado para você com a maior admiração, e em momento algum você desiludiu. Ser sua filha tem sido um privilégio, Deus confiou a ti a missão de ser o nosso pai, deu a você caráter e dignidade, que nos passou diariamente com exemplos. Além de tudo, agradeço também o bom humor, pois é fácil e muito bom estar ao seu lado todos os dias. Você nos faz muito bem! Compartilhar essa vida com você, nascer nessa família, foi a melhor coisa que poderia ter me acontecido! “

Pai, suas atitudes nos inspiram todos os dias, ao se levantar tão cedo para trabalhar e pelo horário em que volta do serviço, tarde da noite, nos mostra que não devemos ter preguiça. Lembro-me disso todos os dias que acordo com pouca vontade, pensando comigo mesma que você é tudo isso hoje porque nunca teve preguiça de levantar e trabalhar. Acima

de todos esses aprendizados, um que não sai da minha cabeça é o que você sempre me dizia em nossas viagens juntos: “faça o que você gosta, nunca o que os outros querem que você faça e se fizer o que ama não precisará se preocupar em ganhar dinheiro ou ser feliz, isso será uma consequência, mas sempre que for fazer algo na sua vida, faça dando o seu melhor.” Obrigada, imensamente pai, por me inspirar todos os dias da minha vida e por todas as palavras doces, todo carinho, ensinamentos e pela imensa paciência comigo, te amo.

À minha mãe obrigada por toda dedicação e amor. Uma vida inteira dedicada a nós, toda a educação, aprendizado e esforço por ser mais, dedico tudo a você mãe. Sei do seu esforço em nos criar praticamente sozinha, quando o pai saía cedo e voltava tarde. Obrigada por tanta dedicação, preocupação e amor. Criar cinco filhas é um serviço árduo e de grande responsabilidade física e espiritual. É uma grande responsabilidade diante de Deus criar e educar, e você faz isso com tanto amor e competência que ele confiou a você cinco almas. Eu não poderia desejar nenhuma mãe melhor do que você. Obrigada pelo seu jeito tão sensível, que sente sempre que não estamos bem ou quando precisamos de ajuda, pelos conselhos, pelos avisos, por ser uma mãe maravilhosa, engraçada e divertida. A vida é mais prazerosa e divertida para mim quando você está perto, te amo maezinha.

Às minhas irmãs Emanuelle e Gabrielle por serem irmãs maravilhosas, engraçadas e bravas!! Sei que estarão sempre dispostas a brigar por mim e saibam que é recíproco. A minha irmã gêmea Marcelle, por ser essa pessoa tão calma, positiva e com o coração tão bom. Obrigada por me ouvir e acalantar meu coração com palavras boas, doces, de paz e de amor. Já te disse isso, mas repetirei: é muito bom ter você comigo nessa vida. Por último, minha irmã Michelle. Você é companheira de vida, sei que posso contar com todas, mas no desespero é para você que ligo e, por algum motivo especial, você sempre tem as palavras e os ensinamentos certos que eu preciso aprender. Obrigada pela força e pelo crescimento espiritual. Se aprendi algumas coisas sobre como Deus age e porque tentar ser uma pessoa melhor, foi com sua ajuda. Muito brigada!

A todas minhas irmãs quero dizer que Deus nos colocou como irmãs de sangue nesta vida, mas nossa união e nosso amor vêm de outras vidas, pois é muito forte, parece já ser construído de longa data, eu amo vocês. Aos meus cunhados amados Fábio e Flávio que tenho o imenso prazer de conviver. Vocês, de maneiras diferentes, me ajudaram a ver a vida de outra forma. Fábio, eu nunca conheci alguém tão guerreiro e com tanta vontade de viver como você. Quando alguém me conta um problema, é sua história que eu conto para mostrar como é

ter garra e vontade de viver, parabéns por ser essa pessoa incrível. Flávio, da mesma forma, você é uma das pessoas mais paciente, tranquila e amável que eu conheço, parabéns por passar tanta paz as pessoas que estão a sua volta. Pedro Vitor (Ticota), obrigada pela companhia e pelos conselhos sempre que preciso, você é meu irmão de alma e estaremos sempre juntos.

Ao Marcelo, meu companheiro, amigo e amor. Se Deus me deu um presente nessa vida, esse presente é você. Meus momentos de alegria com você sempre foram e serão maiores do que os de tristeza ou decepção. Você faz meus dias ainda mais alegres, divertidos e felizes. Obrigada por estar sempre ao meu lado com seu jeito carinhoso, amoroso, engraçado, se preocupando e cuidando de mim. Quero aproveitar para te agradecer, nas situações ruins você me escuta, me dá força, me motiva a continuar, me aconselha e me ajuda a superar qualquer coisa, muito obrigada. Trabalhamos sempre juntos e não sabíamos se isso seria um problema ou não, mas descobri que isso foi ótimo e que tenho muito a aprender ao seu lado. Você é uma pessoa maravilhosa, sempre com vontade, sem preguiça e dá seu melhor em tudo. Tudo que você fizer na sua vida será bem feito porque você é uma pessoa competente que não tem vergonha de dizer que não sabe e ir atrás para aprender. Mas acima de qualquer qualidade admirável em você, te admiro pela sua humildade. Com certeza você é uma inspiração. Te amo.

Ao Senhor Benedito, queria agradecer pelos ensinamentos, horas de conversa e conselhos, vou levá-los na memória para toda vida. Tentarei passar seus ensinamentos para quem eu puder, tentando fazer a vida de outras pessoas mais leve, colorida e com mais flores em seus caminhos, assim como o senhor deixou a minha! O senhor me fez acreditar no bem e que, além disso, tudo na vida acontece para um bem maior. As coisas acontecem pela vontade de Deus, mas que temos livre arbítrio para escolher nossos caminhos. Obrigada por ajudar tantas pessoas sem cobrar nada em troca. O senhor é a minha prova viva de que Deus existe e que ele manda anjos para nos ajudar.

Á Bárbara, minha amiga e irmã de coração, queria agradecer todo carinho comigo sempre, as palavras sinceras e por todos os momentos juntas que fizeram do ultimo ano de mestrado mais engraçado, divertido e alegre. Obrigada pela amizade e sinceridade, que não acabarão por aqui e irão se perpetuar por muito tempo! Adoro você!!

Fábio e Estela, obrigada pela oportunidade de ter aprendido com vocês. Foi um imenso prazer ter conhecido e trabalhado com vocês. Cada um da sua forma, mas acima do aprendizado técnico, tive oportunidade de crescer espiritualmente. Fábio, obrigada por me dar a oportunidade de conhecer alguém que trabalha sem reclamar. Estelinha, até nos momentos de chateação sempre foi muito doce e mostrou ser uma pessoa extremamente sensível. Com certeza é um prazer ter conhecido vocês e nossos momentos juntos foram de grande experiência e muito felizes.

A todas minhas amigas de coração Mariana, Leticia, Jolie, Natália, Marisa, Mel, Gabi Pombo, Laura, Natasha Cripa, Fernanda Carol e a todos os meninos da Tatu-Currido (Fenômeno, Sirgay, Kumiyama, Ponei, Sereia, Mineirinho, Davi, Waldivia, Pinguim, Tucano, Paraguai, Arame, Despacho e Flávio) obrigada por todos os momentos que, com certeza, fizeram meus dias muito mais divertidos, prazerosos e engraçados. Adoro vocês. Estão no meu coração e não sairão nunca mais.

À Dani Passarelli, muito obrigada pela ajuda, dedicação e amizade. Os dias de laboratório não seriam tão bons se não fosse com você me ajudando e ensinando tanto. Obrigada pela paciência, ajuda e imensa dedicação ao seu trabalho. Sempre muito correto e competente. Com você aprendi que se não sabemos algo o melhor a fazer é pedir ajuda. Muito obrigada.

Ao professor Ed Hoffman pelo imenso prazer de ouvi-lo falar, não apenas sobre reprodução animal, mas também sobre o potencial do nosso país para a produção animal, dando um ânimo a mais para trabalhar neste mercado promissor. É um prazer ouvir alguém com ideias tão fantásticas e que seja tão humilde ao mesmo tempo.

Ao Professor Birgel por aceitar participar da minha banca de defesa de mestrado, pelas trocas de ideias sobre a clínica de bovinos e pela ajuda com as cesarianas e tratamentos pós cirúrgicos nos animais do experimento.

Em várias palestras ouvi meu pai dizer uma frase do Raul Seixas que adoro e que diz muito sobre nossa vida e as pessoas que fazem parte dela: “Um sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, um sonho que se sonha junto é realidade”, Obrigada a todos por tornarem esse sonho uma realidade.

Obrigada!

RESUMO

JARDIM, I. B. **Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de apresentações gestacionais.** [Efficiency of a bovine SCNT cloning program and different types of pregnancies presentations]. 2016. 75f. Tese (Mestrado em Biociência Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A clonagem bovina por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) é uma biotécnica ainda pouco eficiente devido aos elevados custos em sua aplicação e às altas perdas gestacionais oriundas de alterações do desenvolvimento embrionário e placentário. Desse modo, o uso comercial da clonagem bovina por SCNT é pouco viável atualmente, sendo aplicada majoritariamente em pesquisa. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou estudar a eficiência de um programa de clonagem por SCNT, identificando pontos críticos no desenvolvimento do conceito, assim como detectar diferentes apresentações gestacionais induzidas por esta biotécnica. Para isso, 215 embriões clonados foram transferidos para receptoras de embriões e 30 prenhezess foram confirmadas pela detecção de batimentos cardíacos no conceito por ultrassonografia transretal, totalizando 14.0% de índice de gestação. Em 6.1% das receptoras foi identificado por ultrassonografia sinais das vesículas embrionárias sem presença de batimento cardíaco (gestações anembrionadas) e em 7.4% das receptoras não foram detectados sinais do conceito embora o CL tenha sido mantido por mais de 25 dias pós-ovulação (CLs persistentes). Este estudo mostrou que os maiores índices de perdas gestacionais ocorreram antes do dia 25 (dia 0 = ovulação). Ao analisar as perdas gestacionais após o diagnóstico de gestação (dia 25 a 35), um maior número de perdas ocorreu entre os dias 30 e 40 (26.7%) e entre os dias 40 e 60 (20.0%), não sendo identificada a formação de placentônios nessas prenhezess. Além disso, as receptoras gestantes que desenvolveram placentônios prolongaram a gestação após esses períodos críticos, sendo detectado um novo aumento da frequência de perdas no terço final da gestação. Sendo assim, o presente estudo confirma a baixa eficiência da técnica de clonagem bovina por SCNT e identifica os períodos críticos do desenvolvimento do conceito, sendo eles o período imediato pós-reconhecimento materno da gestação, anteriormente aos 25 dias, o período de completo desenvolvimento placentário e formação de placentônios, entre os dias 30 e 60, e o período de aumento da exigência funcional da placenta devido ao acelerado desenvolvimento do feto no terço final da gestação. Além disso, pela primeira vez na literatura é relatada a ocorrência das

apresentações gestacionais aberrantes, as prenhez anembrionadas e aquelas com CL persistente após a transferência de embriões clonados por SCNT. Novos estudos são necessários para um melhor entendimento da origem e das causas dessas apresentações, as quais podem ser decorrentes de perdas gestacionais precoces ou mau funcionamento de tecidos do concepto como o trofoectoderma e a massa celular interna.

Palavras-chave: Gestação bovinos, Fenótipos gestacionais, Clone bovino, Perdas gestacionais, Ultrassonografia Doppler.

ABSTRACT

Cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) in cattle is still an inefficient biotechnique due to the high costs for its application and also to the high pregnancy losses resulted from changes in embryonic and placental development. Thus, the commercial use of the bovine cloning by SCNT is not commercially feasible, being mainly applied for research interests. In this context, the present study investigated the efficiency of a cloning program by SCNT with the objective of to identify the critical periods for conceptuses development and to detect different gestational presentations induced by this biotechnique. Two hundred fifteen embryos were transferred into embryo recipient cows and 30 pregnancies were confirmed by heart beats detection in the embryo by transrectal ultrasonography, totaling 14.0% of pregnancy rate. 6.1% of the recipients were diagnosed presenting embryonic vesicles without the presence of heart beats (anembryonic gestations) and 7.4% of the recipients did not present any signal of the conceptus and the CL kept active for more than 25 days post-ovulation (persistent CL). This study showed that the higher rates of embryo loss occurred before day 25 (day 0 = ovulation). Analyzing the data of pregnancy losses after diagnosis of pregnancy (days 25 to 35), higher amount of losses occurred between days 30 and 40 (26.7%) and between 40 and 60 (20.0%). Placentomes were not identified in any of these pregnancies. In addition, the recipient in which presented developed placentonios had their pregnancies prolonged. However, a new increase in the frequency of losses was observed in the final three months of gestation. Thus, this study confirms the low efficiency of bovine cloning by SCNT and identified the critical periods for the development of the conceptus, as the period immediately after maternal recognition of pregnancy, before 25 days of pregnancy, the period of full placental development and placentomes development, between days 30 and 60, and the period of placental functional requirements increase due to the rapid development of the fetus, during the last three months of gestation. Also, this work for the first time in the literature reported the occurrence of aberrant gestational presentations, the anembryonic and persistent CL gestations, after embryo transfer of bovine cloned embryos by SCNT. Further studies are necessary to understand the origin and causes of these aberrant gestational presentations, which may be due to early pregnancy loss or malfunction of conceptus tissues as trophoectoderm and inner cell mass.

Keywords: Bovine cloning, pregnancy, Gestational phenotypes, Pregnancy losses, Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Estudo 1:

Figura 1. Protocolo de sincronização do estro e da ovulação em receptoras de embriões.

Figura 2. Esquema para coletas dos dados ultrassonográficos. Embriões clonados por SCNT foram transferidos para receptoras no dia 7 após a ovulação (D7). Exames ultrassonográficos foram realizados a cada 3 dias de D14-60, a cada 5 dias de D60-150 e semanalmente a partir D150 até o termo.

Figura 3. Distribuição em “boxplot” dos dias das primeiras detecções da vesícula embrionária, do batimento cardíaco (BC) do embrião e dos placentônios.

Figura 4. Distribuição em “boxplot” do dia da primeira detecção de placentônios e da duração das gestações dos animais que apresentaram ou não placentônios.

Estudo 2:

Figura 1. Protocolo de sincronização do estro e da ovulação em receptoras de embriões.

Figura 2. Esquema para coletas dos dados ultrassonográficos. Embriões clonados por SCNT foram transferidos para receptoras no dia 7 após a ovulação (D7). Exames ultrassonográficos foram realizados a cada 3 dias de D14-60, a cada 5 dias de D60-150 e semanalmente a partir D150 até o termo.

Figura 3. Ultrassonogramas do útero e CL em receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT. As das três apresentações gestacionais são exemplificadas, sendo: CNG = gestações normais de clone, CAG = gestações anembrionadas de clone e CPCL = receptora de clone com CL persistente. As imagens acima foram coletadas de receptoras entre os dias 30 aos 33 dias após a ovulação. Os ultrassonogramas da esquerda foram coletados por ultrassonografia em modo-B no corno uterino ipsolateral ao CL e os da direita foram coletados por ultrassonografia em modo-Doppler colorido no CL. Pontos coloridos nos ultrassonogramas de CL representam fluxo sanguíneo. Setas brancas indicam estruturas importantes utilizadas na caracterizam dos fenótipos gestacionais. EP: embrião; VE: vesícula embrionária; MP: membranas placentárias.

LISTA DE TABELAS

Estudo 1:

Tabela 1. Número de vacas utilizadas e ovuladas e taxas de ovulação (%) por protocolo de TETF e geral.

Tabela 2. Resultados de protocolos de sincronização do estro e ovulação para transferência de embriões clones por SCNT.

Tabela 3. Taxas de prenhez (%) por períodos gestacionais até o termo após transferência de embriões bovinos clonados por SCNT.

Tabela 4. Taxas de perdas gestacionais (%) por períodos gestacionais até o termo após transferência de embriões bovinos clonados por SCNT. As taxas foram calculadas em relação ao total de receptoras gestantes no dia 25 e em relação ao total de prenhezes mantidas no período anterior.

Tabela 5. Dias da primeira detecção da vesícula embrionária, batimentos cardíacos, embrião propriamente dito (EP), placentônios e morte fetal por ultrassonografia das prenhezes derivadas de SCNT.

Estudo 2:

Tabela 1. Incidência dos três fenótipos gestacionais encontrados em receptoras de clones bovinos produzidos por SCNT. O número total de animais utilizados em protocolos de sincronização, a taxa de ovulação no final dos protocolos, o número de embriões clonados transferidos e o número de receptoras de embriões clonados avaliadas e caracterizadas em cada um dos três fenótipos gestacionais aos 25 dias de gestação são mostrados.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BE – Benzoato de estradiol
- CAG – Gestação de clone anembrionada
- CL – Corpo lúteo
- CNG – Gestação de clone normal
- COC - Complexos cumulus oócito
- CPCL – Clone com persistência de CL
- eCG – Gonadotrofina coriônica bovina
- EDV - Velocidade no final da diástole
- EP – *Embryo proper*
- GnRH –Hormônio liberador de gonadotrofinas
- IA – Inseminação artificial
- IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
- IFN- τ – Interferon tau
- IM – Intramuscular
- IV – Intravenoso
- IVM - *in vitro*
- Mean V - Velocidade média do fluxo
- P4 – Progesterona
- PBS – Solução tampão fosfato salino
- PGF_{2 α} – Prostaglandina F 2-alfa
- PI- Índice de pulsatilidade
- PSPB - Proteína específica da prenhez B
- PSV - Máxima do pico sistólico
- RI – Índice de resistência vascular
- SCNT – Transferência de nuclear de células somáticas
- TAMV - Média das máximas velocidades
- TE – Transferência de embriões
- TETF - Transferência de embriões em tempo fixo
- US - Ultrassom
- VE – Vesícula embrionária

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Geral	1
1.2.	Estudo 1	2
1.3.	Estudo 2	4
2.	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1.	Biologia do desenvolvimento gestacional inicial e placentação em bovinos	7
2.2.	Clonagem bovina por transferência nuclear de células somáticas e seus principais problemas relacionados com a gestação	10
2.3.	Ultrassonografia transretal em bovinos	13
3.	OBJETIVOS	18
4.	HIPÓTESES	18
5.	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1.	Estudo 1.....	19
5.1.1	Animais	19
5.1.2.	Produção de embriões clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) e transferência dos embriões para receptoras.....	19
5.1.3.	Sincronização do estro e da ovulação.....	20
5.1.4.	Coleta das imagens ultrassonográficas	21
5.1.5.	Coleta dos dados nos vídeos ultrassonográficos	22
5.1.6.	Análise dos dados.....	22
5.2.	Estudo 2	23
5.2.1.	Animais	23
5.2.2.	Produção de embriões clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT)	23
5.2.3.	Sincronização do estro e da ovulação	24
5.2.4.	Coleta e análise dos dados ultrassonográficos	25

6.	RESULTADOS	27
6.1.	Estudo 1	27
6.2.	Estudo 2	34
7.	DISCUSSÃO	38
7.1.	Estudo 1	38
7.2.	Estudo 2	42
8.	CONCLUSÃO	46
8.1.	Estudo 1	46
8.2.	Estudo 2	46
	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. GERAL

O Brasil é um dos países com maior potencial de produção de alimentos, sendo considerado o segundo maior exportador agrícola do mundo (OCDE-FAO, 2015). Esse cenário se deve às suas características favoráveis à produção, como grande extensão em terras agricultáveis, clima favorável, disponibilidade de água e utilização de tecnologias de ponta (MAPA). Neste contexto, a pecuária representa um dos principais destaques dentro do agronegócio brasileiro. Desde 2004, o Brasil assumiu a liderança nas exportações de carnes mundial, produzindo um quinto da carne comercializada internacionalmente, além de possuir o segundo maior rebanho mundial de bovinos, contando com 212 milhões de cabeças (MAPA, AGE 2015).

Sabe-se que a produção animal está embasada no tripé nutrição-genética-sanidade, mas daremos ênfase para a genética voltando-a para a área de reprodução animal, na qual vem se destacando pela utilização de biotécnicas para melhorar ainda mais a produtividade. Entre as biotécnicas utilizadas no Brasil se destaca a produção *in vitro* de embriões (PIV) que produziu, em 2013, 70,8% de todos os embriões FIV produzidos no mundo (IETS, 2014).

Dentro da produção *in vitro* de embriões, a clonagem bovina por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) é uma biotécnica criada com o intuito de acelerar o tempo no melhoramento genético, mas devido aos altos custos e baixas taxas gestacionais, não tem sido utilizada em larga escala na área comercial. No entanto essa biotécnica permitiu e ainda permite novas descobertas e possibilidades no âmbito da pesquisa (Stice et al. 1998) através do seu uso para transgenia, estudos em medicina terapêutica (Wall et al. 1997), utilização para a preservação de animais em extinção e em animais com problemas de infertilidade (Galli et al., 2012; Edwards et al., 2003).

Além do elevado custo, a maior limitação da técnica de clonagem por SCNT é sua eficiência. Em torno de somente 5% de todos os embriões transferidos chegam a termo (Hashizume et al. 2002). Perdas ocorrem ao longo de toda a gestação, com maior frequência entre os dias 30 e 90. Após esse período, as perdas ocorrem mensalmente em taxas constantes de 5 a 10% até o termo (Constant et al. 2006).

Alterações placentárias e fetais são observadas no decorrer da gestação de clones por SCNT como placentas hipoplásicas, cotilédones em menor número, sendo muitas vezes rudimentares ou hipertrofiados (Constant et al. 2006, Hashizume et al. 2002, De Sousa et al. 2001). Além disso, foi relatada a ocorrência de edema na área intercotiledonária e no cordão umbilical, hidroalantose, anasarca, síndrome “large offspring”, entre outras alterações (Everts et al. 2008, Fletcher et al. 2007, Miglino et al. 2007). Todas as alterações descritas estão relacionadas com o incompleto desenvolvimento placentário em paralelo ao incompleto desenvolvimento vascular uteroplacentário (Hashizume et al. 2002, De Sousa et al. 2001).

Com base no exposto, o presente estudo foi realizado de modo a descrever a eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e identificar os pontos críticos gestacionais que resultam nas perdas gestacionais. Para isso, foi realizado o acompanhamento ultrassonográfico detalhado e seriado de receptoras dos embriões clonados desde o dia 14 (dia 0 = ovulação) até a regressão do CL, perda gestacional ou termo. Os resultados obtidos fornecerão informações valiosas para novos estudos sobre as causas, consequências e possíveis intervenções preventivas sobre perdas gestacionais durante a gestação, utilizando o modelo experimental com o uso da clonagem por SCNT na espécie bovina.

1.2. ESTUDO 1

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) em animais domésticos permitiu novas descobertas científicas com inúmeras implicações na produção animal e também na medicina humana. Como exemplo, podemos destacar que a clonagem por SCNT permite produzir cópias de animais com alta importância genética (Kubota et al., 2000; Hoshino et al 2009, Yonai et al 2005), é uma ferramenta para a produção de animais transgênicos utilizados em medicina terapêutica (Wall et al 1997, Richt et al. 2007 Brophy et al., 2003), é capaz de gerar descendentes de pais com problemas de infertilidade ou próximos a extinção (Wells et al., 1998), e pode ser utilizada para testar novas hipóteses sobre a biologia do desenvolvimento durante a prenhez, considerando as anormalidades gestacionais frequentemente observadas nestas gestações, principalmente em bovinos. Atualmente, a espécie bovina é provavelmente a mais utilizada para a produção de clones por SCNT (Obach & Wells 2007; Ross & Cibelli 2010), devido à

facilidade de obtenção de ovários provenientes de abatedouros e pelo interesse comercial nesta espécie.

A eficiência da clonagem em bovinos é baixa e apenas 5% de todos os embriões transferidos atingem o termo (Hashizume et al., 2002). Perdas na prenhez ocorrem durante todo o período gestacional, sendo que 70% delas são perdidas até 35 dias de gestação, seguida por perdas mensais, em taxa de 5 a 10% até o termo (Constant et al. 2006). Várias anomalias placentárias têm sido relatadas em gestações derivadas de SCNT, como cotilédones rudimentares com aspecto hipertrofiado e em baixo número (Constant et al., 2006, Hashizume et al., 2002, De Sousa et al., 2001), edema na área intercotiledonária e do cordão umbilical, hidroalantoide, anasarca fetal e síndrome “large offspring” (Everts et al., 2008, Fletcher et al., 2007). Todas essas mudanças no conceito de clones por SCNT aparentam estar relacionadas com a desregulação do desenvolvimento de tecidos e vasos placentários (Hashizume et al., 2002, De Sousa et al., 2001).

A ultrassonografia transretal em modo B (B-mode) ou em escala de cinzas revolucionou o diagnóstico e monitoramento dos eventos biológicos e patológicos em equinos (Ginther 1995, 1998). O sistema B-mode é usado não somente para identificar e medir estruturas, mas também para a verificação do estado reprodutivo do animal. A tecnologia Doppler, muito utilizada em medicina humana e ciências biomédicas, adiciona informação de fluxo sanguíneo sobre a imagem ultrassonográfica em B-mode, produzindo uma imagem com informações anatômicas e funcionais e em tempo real (Ginther & Utt 2004; Ginther 2007). O exame ultrassonográfico transretal em animais de grande porte é um método confiável para visualizar o desenvolvimento do conceito de forma não invasiva e seriada (Curran et al, 1986;. Beksinski 2009; Kastelic et al., 1989; Ginther 1998; Ginther 2007).

O reconhecimento materno da gestação é um importante evento durante a gestação precoce e se inicia com a secreção de interferon tau (IFNT) pelo trofoblasto durante o alongamento do conceito, entre os dias 14-22 (Dorniak, 2014). Posteriormente, dá-se início a placentação, outro importante evento na gestação precoce, a qual corresponde à fixação da membrana coriônica em ambos os cornos uterinos por volta do dia 22, ao início da formação dos placentônios por volta do dia 31, e à mudança de fase embrionária para fetal por volta do dia 45 (Assis Neto, 2009). A placentação bem sucedida é muito importante para a manutenção e desenvolvimento do feto até o termo. Se prejudicada,

acredita-se que durante cada estágio da prenhez ocorrerão problemas de desenvolvimento gestacional resultando em perdas.

Durante o estágio de desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos clonados por SCNT, é conhecido que o desenvolvimento pode ser retardado, sendo uma possível causa para a placentação deficiente e perdas na prenhez (Schlanfer et al., 2000). Após a transferência de embriões, para um desenvolvimento *in vivo* bem-sucedido, o embrião clonado por SCNT precisa secretar de forma eficiente INFT pelo trofoectoderma e bloquear o processo de luteólise (Spencer & Hansen 2015). No decorrer da gestação, o útero e a placenta tem um importante papel no transporte e excreção de nutrientes e metabólitos fetais, a fim de compensar o rápido crescimento fetal (Ferrell & Ford 1980). Embora estes períodos críticos para a manutenção da prenhez já sejam conhecidos, a frequência na ocorrência de cada um deles a partir de gestações derivadas de SCNT ainda precisam ser elucidadas em detalhes. Além disso, o estudo da inter-relação entre perdas gestacionais e fases do desenvolvimento do concepto poderão fornecer novas perspectivas para a compreensão do desenvolvimento e perdas de conceptos bovinos.

Sendo assim, descreve-se no presente estudo , com utilização da técnica de ultrassonografia em modo B e Doppler, a eficiência de um programa de produção de clones bovinos pela técnica de SCNT e a ocorrência de perdas gestacionais durante toda a gestação. A frequência das perdas gestacionais será estudada por períodos críticos do desenvolvimento do complexo materno-concepto com o objetivo de se entender essa inter-relação. Os resultados deste estudo fornecerão bases para novos estudos sobre gestações comprometidas utilizando como modelo experimental as gestações de clones bovinos produzidos por SCNT.

1.3. ESTUDO 2

A clonagem bovina permitiu e ainda permite novas descobertas e possibilidades no âmbito da pesquisa (Stice et al. 1998), através do seu uso na transgenia, em estudos de medicina terapêutica (Wall et al. 1997), para a preservação de animais em extinção ou com problemas de infertilidade, dentre outras aplicações (Galli et al. 2012; Edwards et al. 2003). Apesar dos benefícios, a técnica é limitada pelo elevado custo e baixa eficiência. Em torno de somente 5% de todos os embriões transferidos chegam a termo (Hashizume et al. 2002). Perdas vão acontecendo ao longo de toda a gestação, principalmente as

perdas iniciais, entre os dias 30 e 90. Após esse período, as perdas ocorrem mensalmente em taxas constantes de 5 a 10% até o termo (Constant et al. 2006).

Várias alterações placentárias e fetais têm sido observadas e sugeridas como sendo associadas às causas das perdas gestacionais (Schlafer et al. 2000), sendo elas as placentas hipoplásicas, com cotilédones em menor número e muitas vezes rudimentares ou hipertrofiados (Constant et al. 2006, Hashizume et al. 2002, De Sousa et al. 2001), ocorrência de edema na área intercotiledonária e no cordão umbilical, hidroalantose, anasarca fetal, e síndrome “large offspring”, entre outras (Everts et al. 2008, Fletcher et al. 2007, Miglino et al. 2007). Todas essas alterações estão relacionadas, em certo grau, com o incompleto desenvolvimento morfovascular placentário (Hashizume et al. 2002, De Sousa et al. 2001).

Quatro períodos críticos do desenvolvimento do conceito clonado por SCNT são identificados depois da TE. O primeiro período ocorre até o Dia 30 onde a taxa de sobrevivência após TE é em torno de 30% (Merighe 2007). Essas perdas podem estar relacionadas a uma ineficiente sinalização do embrião para o reconhecimento materno da gestação e às falhas de desenvolvimento do alantocóron e da placentação inicial. O segundo período crítico ocorre entre os Dias 30 e 60 da gestação. Aproximadamente 40% dos conceitos que sobreviveram até o Dia 30 morrem neste curto período (Merighe 2007) onde placentas hipoplásicas com cotilédones rudimentares são observadas (Stice et al. 1996; Hill et al. 2000; Edwards et al. 2003). O terceiro período crítico se dá durante os dias 60 e 180, em torno de 50% das gestações são perdidas (Merighe 2007). As placentas normalmente aparentam ser normais, mas o número de cotilédones é reduzido e o feto e camadas placentárias podem se apresentar edematosos e espessos. O quarto ou último período crítico corresponde ao último trimestre da gestação. Em torno de 25% das gestações que chegam até o Dia 180 serão perdidas antes do dia previsto do parto (Merighe 2007).

Em bovinos, a transferência de embriões é realizada no dia 8 pós-fertilização (7 pós ovulação). Neste dia, a estrutura transferida é um blastocisto com suas células organizadas em massa celular interna e trofoectoderma, os quais darão origem respectivamente ao embrião e às membranas do conceito (Betteridge & Fléchon 1988). Blastocistos apresentam um formato esférico. Utilizando a ultrassonografia, Kastelic et al. (1988) reportaram que no dia 9, 78% das vesículas embrionárias ainda eram esféricas e 23% já se apresentavam oblongas, ou seja, a vesícula embrionária esférica alonga-se assumindo um

formato tubular no lúmen uterino. Em torno do dia 17, o concepto alongado ocupa toda a extensão do lúmen uterino do corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo e em torno do dia 20 o concepto estende-se por toda a extensão do corno uterino contralateral. Estudos detalhados sobre a morfogênese do concepto e a placentação precoce em bovinos estão disponíveis na literatura (Greenstein et al. 1958; King et al. 1980; 1981; 1982).

A placentação não é um processo uniforme, seu início se dá em áreas vicinais ao embrião e se espalha progressivamente deste ponto por toda a superfície do concepto; sendo caracterizada pela adesão e interdigitação microvilal entre o epitélio materno e as células trofoblásticas. A expansão do alantoide, iniciada em torno do dia 20, é ampla entre os dias 28 e 30. Neste momento, o alantoide entra em contato com o trofoectoderma originando o córion. Entre os Dias 31 e 33, os vilos coriônicos primários com áreas de vascularização mesenquimal são observados. Eles são estruturas ovais com coloração rosácea e formarão os futuros cotilédones. Placentônios primordiais com microvilos, tênue adesão entre o epitélio materno e fetal e um sistema vascular primitivo são detectados em torno do Dia 32 (King et al. 1979; Schlafer et al. 2000). Após o primeiro mês de gestação, a placentação continua com as carúnculas induzindo a hipertrofia e hiperplasia dos vilos cotilédonários, formando maiores e mais complexos placentônios em torno do Dia 40 (King et al. 1979; Schlafer et al. 2000). As maiores taxas de perda gestacional em vacas naturalmente concebidas são observadas durante os dois primeiros meses de gestação, exatamente durante o período de intensas alterações vasculares e arquiteturais uteroplacentárias.

Com base no exposto, este estudo teve como objetivo descrever a ocorrência, detalhando os aspectos ultrassonográficos e quantificando a incidência, de diferentes apresentações gestacionais observadas em estudos prévios de nosso laboratório após transferência de embriões clonados por SCNT. Apresentações gestacionais aberrantes podem estar relacionadas às elevadas perdas gestacionais normalmente observadas nas gestações de clones.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO GESTACIONAL INICIAL E PLACENTAÇÃO EM BOVINOS

Por volta dos dias 3 a 5 após a fertilização, o embrião bovino possui entre 8 a 16 células e chega ao lúmen uterino na fase de mórula ou blastocisto inicial (Bazer et al., 2012). Entre os dias 6 e 8, com 32 a 64 células, ocorre na mórula a compactação das células embrionárias seguida pela fase de blastulação, onde o interior do embrião se enche de líquido, formando a blastocele, e ele passa a ser chamado de blastocisto. Ao final da blastulação, o blastocisto tem dois tipos celulares que se organizam em duas áreas distintas, o trofoectoderma recobrendo toda a parede dessa nova estrutura e um aglomerado celular polarizado no blastocele denominada de massa celular interna. O trofoectoderma dará origem aos anexos embrionários e a massa celular interna ao embrião propriamente dito (Schlanfer et al., 2000).

Após entrar no lúmen uterino e se diferenciar nos dois tipos celulares acima descritos, em torno do dia 9, pelo crescimento do blastocisto, ocorre a eclosão da zona pelúcida seguida pelo rápido alongamento do blastocisto, que até então se apresentava na forma esférica, permitindo agora que o embrião inicie uma nova etapa do seu desenvolvimento intrauterino. As principais fases do desenvolvimento após a eclosão são: alongamento dos anexos placentários, aposição dos tecidos fetais e maternos e adesão tecidual definitiva com íntimo contato entre as membranas embrionárias e o endométrio (Bazer et al., 2012, King et al., 1981). Entre essas fases estão inseridos alguns acontecimentos simultâneos e muito importantes para a manutenção da gestação, sendo eles o reconhecimento materno da gestação e a formação dos anexos placentários. Por volta do dia 17 o concepto se expande e preenche quase que por completo o corno ipsolateral ao corpo lúteo. Entre os dias 18 a 24 os dois cornos uterinos estarão totalmente preenchidos pelo concepto contendo líquido dentro de suas membranas (Bazer et al., 2012; King et al., 1981).

Paralelamente ao alongamento embrionário ocorre o reconhecimento materno da gestação que se dá em bovinos pela liberação do interferon-tau produzido pelo trofoectoderma a fim de bloquear o processo de luteólise. A liberação do interferon-tau se inicia em torno do dia 12, chegando ao platô de liberação entre os dias 16 e 18 e se estendendo até por volta do

dia 22 de gestação (Bazer et al., 1997, Dorniak, 2014). O interferon-tau age inibindo diretamente a expressão de receptores endometriais de ocitocina (Telgman et al., 2003), que são responsáveis por estimular a liberação pulsátil de prostaglandina F₂α (PGF₂α), impedindo assim a ocorrência da luteólise (Romero et al., 2015; Bazer et al., 1997).

A fase conhecida como de aposição ocorre por volta dos dias 16 a 20 onde os anexos embrionários, ao se expandirem na fase de alongamento, se sobrepõem em um suave contato ao tecido materno (King et al., 1980; Leiser & Kaufmann, 1994). Nesta fase e até a completa fixação do embrião no útero, microvilos estão presentes nas células do epitélio uterino em contato com a superfície trofoblásticas fetal (King et al., 1980). Após o dia 20 de gestação ocorre a fase de adesão, na qual se fortalece a ligação do trofoectoderma nas regiões carunculares e intercarunculares do endométrio (Bazer et al., 2012; King et al., 1980). Por volta do dia 24 ainda existem microvilos em algumas células do epitélio uterino e trofoblástico, mostrando que a adesão ao útero materno não está completa (King et al., 1980; King et al., 1981; Leiser & Kaufmann, 1994). Essa última fase se estende até por volta do dia 29 (King et al., 1980).

Por volta do dia 19 as células binucleadas se originam das células trofoblásticas, sendo continuamente formadas durante toda a gestação (Bazer et al., 2012). As células binucleadas gigantes ou células binucleadas trofoblásticas têm como característica um citoplasma grande e núcleo disperso (King et al., 1980). Por volta dos dias 20 e 21, o número de células gigantes trofoblásticas é igual ao de células gigantes endometriais, excedendo esse número por volta do dia 24, quando há células gigantes trofoblásticas por todo o córion (King et al., 1981). Essas células migram do endométrio coriônico invadindo o epitélio endometrial materno entre as ligações intercelulares denominadas “tight-junctions” (Bazer et al., 2012; Wooding 1992). Há evidências mostrando que as células gigantes secretam alguns hormônios e proteínas específicas, como lactogênio placentário, progesterona, estradiol e proteína específica da prenhez B (PSPB) (Wooding, 1992).

Paralelamente à fase de adesão dos tecidos materno-fetais acontece o desenvolvimento dos anexos placentários: saco vitelínico, âmnio e alantoide juntamente com a formação de seus vasos. O primeiro a ser formado é o saco vitelínico que é originado do acúmulo de líquido da blastocela no início da embriogênese (Schlanfer et al., 2000). Em torno do dia 22, o saco vitelínico se divide em três porções: ducto vitelínico, centro e projeções (Neto et al., 2010; Neto et al., 2012). Esse desenvolvimento continua até por volta dos dias 30

e 37, após o qual o desenvolvimento para, ocorrendo a involução do saco vitelínico no dia 45 e sendo encontrados apenas vestígios deste em torno do dia 50.

O próximo anexo placentário que se desenvolve é o âmnio que inicia seu desenvolvimento por volta do dia 19 de gestação. Ele circunda o embrião de forma firme formando uma fina camada que marca a zona embrionária no corno ipsolateral ao corpo lúteo. O âmnio continua a aumentar lentamente com o acúmulo de líquido, mas um crescimento distinto e mais rápido em relação ao embrião ocorre por volta do dia 40 (Neto et al., 2009; Neto et al., 2010).

O último anexo placentário a se formar é o alantoide que tem rápida expansão por volta do dia 25 com vascularização na região mesometrial próxima ao embrião. Em torno do dia 30 a vascularização na região antimesometrial já existe apesar de ser discreta (Neto et al., 2010). A expansão dramática do alantoide faz com que ele se una ao trofoectoderma e essa fusão origina o córion por volta dos dias 28 e 30 (Schlanfer et al 2000). A vascularização alantoideana vai aumentando dos dias 30 aos 50, sendo relatado um aspecto avermelhado nas regiões cotiledonárias (Neto et al., 2010).

De forma geral, a placenta em bovinos é classificada como cotiledonária, sinepiteliocorial e adeciuada (Amoroso, 1952; Bazer et al., 2012, Leiser & Kaufmann, 1994). A ligação do córion com o epitélio materno é feito em locais específicos denominados de cotilédones, por isso a placenta é classificada como cotiledonária. Os cotilédones são unidades placentárias originadas do trofoblasto fetal que formam vilos coriônicos arborizados, ou seja, uma rede de vilos que se estende sob as projeções do endométrio materno chamadas de carúnculas, formando uma aposição do tecido materno e fetal (Leiser & Kaufmann, 1994; Wooding et al., 1997). Bovinos podem apresentar de 75 a 120 carúnculas ao longo do endométrio (Paulesu et al., 2012; Schlanfer et al, 2000). As junções das carúnculas e dos cotilédones formam a principal unidade de troca entre mãe e feto, os placentônios (Schlanfer et al, 2000). Por volta do dia 40, os placentônios são grandes e complexos, formados pela união completa dos vilos coriônicos com o tecido caruncular (King, et al., 1981; Schlanfer et al, 2000).

A placenta também é classificada como sinepiteliocorial pela quantidade de tecidos existentes separando o sangue materno do sangue fetal. A placenta de bovinos apresenta todas as camadas de tecidos (endométrio, interstício e epitélio) tanto do lado materno como fetal,

mas transitoriamente os capilares maternos ficam em contato direto com o epitélio coriônico através da ligação das células binucleadas trofoblásticas com o epitélio uterino e isso faz com que seja classificada como sinepiteliocorial (Amoroso, 1952; Bazer et al., 2012; Wooding 1992).

2.2 CLONAGEM BOVINA POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS E SEUS PRINCIPAIS PROBLEMAS RELACIONADOS COM A GESTAÇÃO

Clonagem é o termo utilizado para produção de indivíduos geneticamente iguais através de um processo reprodutivo assexuado. Em 1997, o dogma de que células somáticas diferenciadas eram incapazes de readquirir totipotência gerando um novo indivíduo foi quebrada com o anúncio do nascimento do primeiro clone por SCNT, a ovelha “Dolly” (Wilmut et al. 1997). A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) é uma biotécnica que permitiu e ainda permite novas descobertas e possibilidades no âmbito de pesquisa humana e em animais de produção (Edwards et al., 2003; Stice et al. 1998), assim como abriu portas para o uso da transgenia e estudos de medicina terapêutica (Wall et al. 1997). Além disso, aplica-se a clonagem na preservação de animais em extinção e/ou com problemas de infertilidade. Devido aos problemas ocasionados por essa técnica e encontrados durante o desenvolvimento gestacional e no indivíduo recém-nascido, sua utilização é justificada em investigações fisiopatológicas mais aprofundadas para o entendimento dos mecanismos envolvidos em tais alterações (Galli et al., 2012; Edwards et al., 2003).

Os princípios da clonagem por SCNT são basicamente a utilização de oócitos oriundos de ovários de abatedouro ou coletados *in vivo*, maturação *in vitro* dos oócitos até a fase de metáfase II, enucleação do oócito, transferência do núcleo de uma célula somática (doadora) para o oócito e indução do desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto por eletrofusão (Galli et al., 2012; Edwards et al., 2003; Campbell et al., 1996). Embriões que atingiram o estágio de blastocisto após 7 dias em meio de cultura são então transferidos para receptoras de embriões sincronizadas em 7 dias pós-ovulação.

Os problemas associados à clonagem por SCNT são inúmeros e compreendem as fases de desenvolvimento inicial do embrião no laboratório, alterações gestacionais e problemas

pós-natais. Como exposto, a primeira fase crítica da clonagem por SCNT é a produção *in vitro* de blastocistos (Edwards et al. 2003; Mello et al. 2003; Wells et al. 2004), sendo relatado taxas de 55% (3076/5629) de fusão nuclear e de 8% (438/5629) de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Após a transferência do embrião, são identificados quatro períodos críticos gestacionais: (1) 70% dos embriões são perdidos até o dia 30; (2) 40% dos embriões que ultrapassaram o primeiro mês são perdidos até o dia 60; (3) 50% das gestações mantidas após o dia 60 são perdidas durante o terceiro trimestre de gestação; (4) 25% das prenhez mantidas no terceiro trimestre de gestação são perdidas anteriormente ao termo. Essas perdas gestacionais podem estar relacionadas com uma ineficiente sinalização do embrião para o reconhecimento materno da gestação, baixo estímulo do remodelamento uterino pelo embrião, alterações imunológicas, reduzido número de cotilédones, camadas espessas e edematosas da placenta, hidroalantoide, hipertrofia de cotilédones, edema na área intercotiledonária e/ou anasarca fetal (Merighe 2007; Stice et al. 1996; Hill et al. 2000; Edwards et al. 2003). Ao final, a taxa de nascimento de bezerros vivos após TE de embriões clonados por SCNT atinge somente 7 a 10% do total de embriões transferidos (Wells et al. 1999; Merighe 2007).

Durante o primeiro trimestre de gestação em clones por SCNT, as perdas são associadas a uma placentação anormal, apresentando um reduzido número de placentônios e inadequada vascularização do saco alantoideano (Wells et al. 1999; Hill et al. 2000). Nesse contexto são sugeridos três diferentes fenótipos de placenta entre os dias 30 e 90 com base em sua arquitetura: (1) crescimento rudimentar; (2) cotilédones hemorrágicos; e (3) aspecto macroscópico semelhante à prenhez naturalmente concebidas. Tais alterações placentárias são determinantes para a sobrevivência fetal entre os Dias 30 e 90. Antes do Dia 45, placentas oriundas de abortamentos apresentam epitélio coriônico e formação vascular deficiente. Placentas de fetos que sobrevivem até o Dia 50 apresentam melhor desenvolvimento epitelial, entretanto sem a formação de placentônios funcionais, resultando em morte fetal por privação de nutrientes. As placentas que apresentam número suficiente de placentônios para suporte do desenvolvimento fetal são capazes de manter a gestação até o segundo trimestre. Sugere-se que a principal causa dessas alterações é originária de mudanças epigenéticas de reprogramação nuclear (Smith et al., 2012). Após o procedimento de SCNT, o perfil de expressão gênica das células adultas diferenciadas é reprogramado em um novo perfil de expressão gênica embrionária, devendo ser eficientemente estabelecido para permitir o desenvolvimento do clone (Hiendleder et al. 2004; Loi et al. 2007; Niemann et al. 2008). Entretanto, alterações da metilação do DNA têm sido encontradas em embriões bovinos

produzidos por SCNT e no feto tanto em níveis globais quanto gene-específicos (Dean et al. 2001; Kang et al. 2001; Hiendleder et al. 2004).

O último trimestre da gestação é caracterizado por intenso crescimento fetal paralelo ao aumento das trocas transplacentárias de nutrientes, gases e excreções (Reynolds et al. 1986; Reynolds et al. 2006). Prenhez de clones por SCNT que sobrevivem durante o início e metade da gestação são frequentemente complicadas durante o último trimestre. Síndrome “large offspring”, hidroalantose e placentomegalia são alterações frequentes. Constant et al. (2006) mostraram evidências que esse achado é mais relacionado com a síndrome “large placenta” e não com a síndrome “large offspring”. Nesse estudo, vacas prenhes de SCNT foram abatidas nos Dias 180 e 280 de gestação e os achados macroscópicos mostraram um crescimento excessivo da placenta precedendo o crescimento excessivo fetal, não sendo o feto em uma forma compensatória o fator estimulatório do crescimento placentário. Em outro trabalho, a estrutura e a arquitetura microvascular da placenta foram estudados em 19 prenhez de clones que chegaram a termo (Miglino et al. 2007), detectando edema no cordão umbilical e nas membranas fetais, assim como extensas áreas do corioalantoide ausentes de placentonios. Nas carúnculas, as criptas estavam dilatadas e frequentemente apresentavam mais vilos do que somente o vilos primário. Estes dados sugerem uma compensação placentária para suprimento das demandas nutricionais do feto durante o último trimestre da gestação por hipertrofia dos placentonios em conjunto com aumentado número de vilos.

Comparando a embriogênese de animais produzidos por transferência nuclear de células somáticas com animais naturalmente-produzidos, sabe-se que as alterações encontradas em clone são justificáveis. O genoma de animais naturalmente produzidos volta a totipotência e sofre uma reprogramação genética para originar um novo indivíduo (Huan et al, 2015; Campbell et al., 1996). Diferente dos animais naturalmente-produzidos, os clones não têm uma reprogramação tão eficiente e esse conflito na reprogramação genética pode causar as perdas gestacionais e anormalidades ao longo de toda a gestação (Chavatte-Palmer et al., 2012; Huan et al., 2015).

Em bezerros nascidos vivos e produzidos por SCNT, as alterações e sinais clínicos mais frequentes são distresse depois do parto, cardiomiopatia dilatada, deficiência pulmonar em surfactantes e hipertensão pulmonar. As alterações do bezerro sempre estão associadas às alterações na placenta como edema nas membranas, hidroalantose e edema no cordão umbilical (Hill et al. 1999).

De acordo com essa revisão, vários estudos demonstram elevadas taxas de perdas gestacionais e de alterações encontradas ao longo de todo o período gestacional e pós-natal de clones bovinos. Todas essas observações são importantes para investigações de perdas pontuais, seja por erros de reprogramação epigenética, reconhecimento materno, placentação, equilíbrio da dinâmica de trocas materno-fetal, dentre outras. Deste modo, conhecendo a fundo a fisiopatologia dessas gestações, poderemos futuramente intervir através de tratamentos utilizando fármacos, que possam controlar essas alterações da fisiologia gestacional, a fim de melhorar as taxas do sucesso dessa técnica.

2.3 ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL EM BOVINOS

A ultrassonografia transretal em modo B (B-mode) ou em escala de cinzas revolucionou o diagnóstico e monitoramento dos eventos biológicos e patológicos na reprodução de grandes animais (Ginther 1995). Sua introdução facilitou o manejo reprodutivo por dar mais consistência aos diagnósticos antes realizados por palpação retal e observação comportamental. Avaliações de sazonalidade dos ovários, alterações no útero como presença de líquido, cistos, edema, presença do sêmen após inseminação, gestação, viabilidade fetal, alterações gestacionais na placenta e feto, involução uterina no pós-parto, entre outras funções de mensuração de estruturas são as principais práticas utilizando a ultrassonografia (Ginther & Pierson, 1984; Ginther, 1995).

O sistema B-mode é usado não somente para identificar e medir estruturas, mas também para a verificação do estatus reprodutivo do animal. Mais ainda, a rota transvaginal pode ser usada em procedimentos guiados pela ultrassonografia B-mode para injeção de substâncias no útero ou em folículos em experimentos científicos (fatores de crescimento, hormônios, drogas, outros), injeção de gametas (transferência de embriões ou inseminação artificial) ou aspiração (amostragem de fluidos, células) de tecidos de porções anatômicas específicas do trato reprodutivo (aspiração de oócitos, biópsia luteal, injeções e aspirações no saco amniótico, outros) dentre outras técnicas (Ginther 1995).

O interesse no entendimento do controle fisiológico das alterações do fluxo sanguíneo no trato reprodutivo dos animais não é novo. Nas décadas de 60 e 70, muitos experimentos foram realizados para mensuração do volume do fluxo sanguíneo ou perfusão dos órgãos reprodutivos, sendo este dado correlacionado com o metabolismo de gases e nutrientes. Até

agora, mensurações do fluxo sanguíneo eram realizadas por diferentes técnicas invasivas e indiretas, como o uso de cateteres implantados cirurgicamente dentro do vaso sanguíneo de interesse. Usando esta metodologia, uma substância era sistematicamente injetada por uma artéria e coletada em série por uma veia. Com base no equilíbrio dessa difusão, o fluxo sanguíneo era estimado. Naquela época, muitos estudos usaram esta técnica ou outra técnica similar para estudar o fluxo sanguíneo nos órgãos reprodutivos durante as diferentes fases reprodutivas (Huckabee *et al.* 1961, 1968, 1970; Caton *et al.* 1974 Anderson *et al.* 1977, Greiss & Anderson 1969, 1970).

No final das décadas de 70 e 80, muitos estudos foram realizados para a mensuração do fluxo sanguíneo no trato reprodutivo de vacas, porcas e ovelhas com o uso de probes eletromagnéticas. Essas probes eram fixadas cirurgicamente ao redor de um vaso principal como, por exemplo, as artérias uterinas e ovarianas. O fluxo sanguíneo era então eletronicamente calculado. Como nas técnicas anteriormente utilizadas, este procedimento é invasivo e necessita de cirurgia para seu implante ou fixação, mas propiciou um avanço devido ao cálculo direto e automático do fluxo sanguíneo. Usando esta metodologia, o fluxo sanguíneo no trato reprodutivo foi estudado em vacas (Ford *et al.* 1979, Davis & Collier 1985, Wolfenson *et al.* 1985, Knickerbocker *et al.* 1986), porcas (Ford & Christenson 1979, Ford *et al.* 1982a, 1982b) e ovelhas (Abrams & Sharp 1977, Ford 1982, Roman-Ponce *et al.* 1983, Caton & Kalra 1986).

A tecnologia ultrassonográfica no modo Doppler vem sendo utilizada há décadas em medicina humana e ciências biomédicas, devido ao fato de adicionar informação de fluxo sanguíneo sobre a imagem ultrassonográfica em B-mode, e de produzir uma imagem com informações anatômicas e funcionais em tempo real (Ginther & Utt 2004; Ginther, 2007). A ultrassonografia em modo-Doppler é basicamente constituída por duas modalidades básicas de representação das imagens, o modo-espectral e o modo-Doppler colorido. O modo-Doppler colorido é subdividido em dois modos, o color-Doppler e o power-Doppler. A distinção básica entre as duas modalidades está relacionada à metodologia utilizada para selecionar o alvo (estrutura como um todo ou um vaso específico) no órgão ou tecido de interesse (Ginther, 2007).

O modo Doppler-espectral foca diretamente em vasos sanguíneos. As características do fluxo sanguíneo em um ponto específico ou focal de um vaso são acessadas após o posicionamento do cursor amostral do modo Doppler-espectral no lúmen do mesmo. As alterações entre as frequências do som emitido e do eco captado, e a amplitude dos mesmos

são utilizadas para gerar uma representação gráfica da dinâmica vascular em formato de onda senoidal na tela do console e cada ciclo dessa onda representa um ciclo cardíaco completo (picos de sístole e diástole). O ponto mais elevado no traçado do gráfico espectral representa a velocidade máxima do pico sistólico (PSV). Similarmente, o ponto mais baixo do gráfico, imediatamente anterior ao início do próximo pico sistólico representa a velocidade no final da diástole (EDV). A média de todas as velocidades máximas do ciclo cardíaco dividida pelo tempo de duração do mesmo é chamada de média das máximas velocidades (TAMV). A média das velocidades calculada por cálculo integral em um ciclo cardíaco, ou seja, todas as velocidades são consideradas e não somente as velocidades máximas como no cálculo do TAMV, dividida pelo tempo de duração do mesmo é chamada de velocidade média total (Mean V). O volume do fluxo sanguíneo por minuto (V; ml/min) pode ser automaticamente calculado pelo console do ultrassom quando se tem o conhecimento do ângulo de insonação, do diâmetro do vaso e da velocidade média do fluxo (Mean V). Medidas dos valores exatos ou reais das velocidades do fluxo sanguíneo, necessárias para o cálculo de volume, são dependentes do conhecimento do ângulo de insonação (ângulo formado entre o plano de emissão das ondas sonoras pelo transdutor e o plano do fluxo vascular nos vasos sanguíneos) (Ginther & Utt 2004; Ginther, 2007).

Os índices no modo espectral-Doppler são alternativos ao uso de velocidades reais que nem sempre são passíveis de serem calculadas. Índices são razões das medidas de velocidade em pontos diferentes da onda senoidal. Além disso, índices são boas medidas da hemodinâmica do órgão ou do tecido abaixo do ponto ao qual a mensuração foi realizada (Ginther & Utt 2004). Os índices mais utilizados são resistência vascular (RI) e pulsatilidade (PI). Os índices são especialmente úteis em mensurações de fluxo sanguíneo em vasos de pequeno calibre, tortuosos nos quais o escaneamento de um segmento em corte longitudinal não é possível devido à impossibilidade do cálculo do ângulo de insonação e, conseqüentemente, não permitindo a estimação das velocidades reais do fluxo. Neste caso, o fator ângulo de insonação é matematicamente cancelado nos procedimentos de cálculo não interferindo na mensuração desses parâmetros. Além disso, os índices representam muito bem a hemodinâmica e são consistentes, ou seja, não apresentam variações elevadas entre mensurações repetidas num mesmo momento no mesmo indivíduo (Ginther, 2007).

As imagens no modo color-Doppler estimam as velocidades do fluxo sanguíneo codificando-as e apresentando-as como regiões coloridas sobrepostas à imagem em B-mode (escala de cinzas). As velocidades do fluxo sanguíneo são estimadas em toda a imagem. Toda

a estrutura é considerada e não somente o vaso sanguíneo principal como no caso da modalidade espectral-Doppler, o que facilita uma melhor avaliação funcional do tecido ou órgão. A vascularização é estimada em tempo real durante o escaneamento e normalmente graduada em sistema de escores (ex. 1-4 para nenhum ao máximo) ou em percentuais de área. A extensão da área vascularizada dentro da área total observada pode ser estimada subjetivamente em tempo real e objetivamente por análise das imagens gravadas (Ginther, 2007). Essa forma de avaliação vascular usando color-Doppler tem se mostrado com grande aplicabilidade para ambos os propósitos, clínico e científico, devido ao seu foco direto no tecido ou órgão de interesse. Uma vantagem importante deste sistema de estimação subjetiva por escores é que toda a estrutura, ou porção da estrutura, pode ser avaliada em tempo real paralelamente ao escaneamento morfológico da mesma. A subjetividade dos sistemas de escore pode ser convertida em dado objetivo, especialmente para estudos, em trabalhos científicos, com a filmagem de todos os escaneamentos. Os filmes podem ser utilizados para uma nova avaliação por escores por outro operador com total desconhecimento da identidade dos animais e até mesmo com desconhecimento da hipótese que está sendo testada. Além disso, as áreas coloridas ou os agregados de pixels também podem ser selecionados das imagens, extraídas e numericamente estimados por um software específico (Ginther & Utt 2004; Ginther, 2007).

Bollwein e colaboradores (2000) avaliaram alterações de fluxo sanguíneo nas artérias uterinas durante o ciclo estral em vacas e medições foram feitas usando o modo espectral para calcular o índice de resistência (RI), índice de pulsatilidade (PI) e/ou média das velocidades máximas (TAMV). Todos estes pontos finais são indicadores da capacidade do órgão para receber sangue. Os resultados foram semelhantes aos trabalhos anteriores utilizando sondas eletromagnéticas (Ford et al. 1979, Ford & Chenault 1981). O fluxo de sangue uterino aumentou em paralelo com o aumento dos níveis circulantes de estrógeno durante o ciclo estral.

Alterações do fluxo sanguíneo na artéria uterina têm sido estudadas por ultrassonografia Doppler em vacas durante a prenhez (Bollwein et al., 2002a, Panarace et al., 2006, Krueger et al. 2008, Honnens et al. 2008b). Bollwein et al. (2002a) caracterizou as alterações do fluxo sanguíneo uterino mensal durante a prenhez. O índice de resistência (RI) foi menor e o tempo médio de velocidade máxima (TAMV) e volume do fluxo sanguíneo maior na artéria ipsilateral ao concepto. Durante a prenhez, os valores do RI diminuíram e TAMV e volume de fluxo sanguíneo aumentaram. O aumento do TAMV representa maior

fluxo de sangue nas artérias, enquanto uma diminuição em RI representa reduzida resistência ao fluxo de sangue em vasos sanguíneos distais ao local de avaliação. Panarace et al. (2006) estudaram uma vez por semana 13 vacas prenhes a partir dos Dias 30-270 da prenhez. Os autores descobriram que o RI das artérias uterinas diminuiu continuamente durante a prenhez e foi menor no lado ipsolateral ao concepto. Exatamente o oposto foi encontrado para TAMV. Estas descobertas indicam um decréscimo na resistência vascular no útero durante a prenhez. Além disso, a diminuição foi maior no corno gestante. Um grande aumento no volume de sangue foi observado após a 16ª semana no lado do corno gestante e um ligeiro aumento do volume de sangue foi observada após a 20ª semana no corno contralateral. Recentemente, o fluxo sanguíneo uterino de vacas cíclicas e vacas gestantes durante as três primeiras semanas de prenhez foi examinado (Honnens et al. 2008b). TAMV maior foi observado nas artérias uterinas de vacas cíclicas no dia 18 comparado a vacas prenhes. Aumento do estrogênio e diminuição da progesterona foram correlacionados com a TAMV alterada neste período. Os autores não encontraram diferenças entre o corno uterino ipsolateral ao concepto e o corno contralateral.

Silva & Ginther (2010) avaliaram as alterações do fluxo sanguíneo uterino utilizando ultrassonografia no modo color-Doppler em novilhas. A perfusão sanguínea foi estudada nas áreas do endométrio e miométrio durante o ciclo estral e a prenhez. O aumento da vascularização uterina em animais não gestantes foi temporalmente associado com o aumento pré-ovulatório de estradiol. Em novilhas prenhes a vascularização uterina aumenta no corno ipsolateral ao concepto nos dias 19 a 40. A vascularização do corno contralateral permanece baixa até o dia 32, quando começa a subir, atingindo vascularização aproximadamente igual ao corno ipsolateral em torno do dia 40. O aumento da vascularização é temporalmente paralelo ao desenvolvimento do saco alantoide no interior de cada corno uterino, ou esta intimamente relacionada com a formação do corioalantoide durante o desenvolvimento do concepto.

3. OBJETIVO GERAL

Este estudo foi delineado para descrever detalhadamente o desenvolvimento da gestação de clones bovinos produzidos por SCNT deste a TE até a completa regressão do CL, a morte embrionária/fetal ou até o termo.

4. HIPÓTESES

- Maior incidência de perdas gestacionais em prenhez de clones bovinos por SCNT é observada da detecção do conceito até o dia 60 da gestação, coincidindo com o período de placentação.
- Perdas gestacionais podem ser preditas com base no exame das alterações de desenvolvimento (morfovasculares) do conceito visualizadas por meio de exame por ultrassonografia nos modos B e Doppler.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ESTUDO 1

5.1.1. Animais

Trinta e seis vacas sem raça definida e quarenta e quatro vacas Nelores (*Bos taurus indicus*) sem anormalidades aparentes do trato reprodutivo foram utilizadas como receptoras de embrião de janeiro de 2013 a outubro de 2015 na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, Pirassununga, São Paulo, Brasil. As vacas foram mantidas em pastagens de *Panicum maximum* (variedade Mombaça) com acesso *ad libitum* a sal mineral e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) - Ministério da Ciência e Tecnologia e pelo Comitê de Ética para Uso Animal e Experimentação (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP).

5.1.2. Produção de embriões clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) e transferência dos embriões para receptoras

Ovários provenientes de vacas oriundas de abatedouro foram utilizados para a obtenção de oócitos. Folículos ovarianos com diâmetro de 3 a 8 mm foram aspirados. Os complexos cumulus oócito (COC) recuperados, com mais de quatro camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo, foram selecionados para a maturação *in vitro* (IVM), segundo técnica previamente descrita (SANGALLI et al., 2012).

Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados a 38,8 °C, umidade máxima do ar e 5% de CO₂. Fibroblastos da pele de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) foram utilizados como células doadoras de núcleo. As células doadoras foram mantidas numa solução de 0,5%

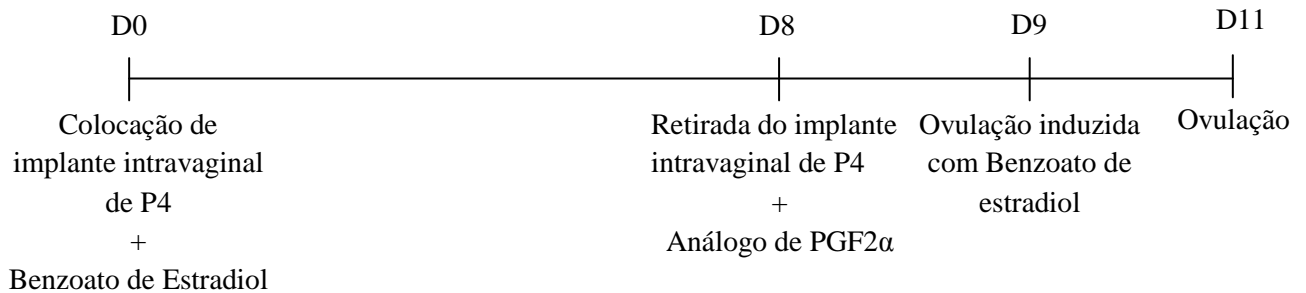
de soro fetal bovino durante 72 h antes da micromanipulação, a fim de sincronizar a fase do ciclo da célula para G1/G0. A IVM, enucleação do oócito, reconstrução do embrião, e ativação do embrião foram realizados seguindo a rotina do laboratório de clonagem previamente descrita (SANGALLI et al., 2012).

Os embriões foram mantidos em micro gotas com 100 uL de meio SOFaa suplementado com 5 mg mL⁻¹ de BSA sem ácidos gordos, e 2,5% (v/v) de FBS sobreposta com óleo mineral. Grupos de 20 embriões foram mantidos no mesmo meio por 7 dias até o estágio de blastocisto (SANGALLI et al., 2012). Blastocistos com sete dias de desenvolvimento derivados da clonagem por SCNT foram então individualizados, envasados em palhetas de 0,25 mL e transferidos para receptoras bovinas sete dias pós-ovulação pelo procedimento não cirúrgico de transferência de embriões.

5.1.3. Sincronização do estro e da ovulação

As receptoras de embriões foram submetidas ao protocolo de sincronização do estro e da ovulação em tempo fixo segundo protocolo detalhado na Figura 1. Aquelas que não responderam ao protocolo, que não foram diagnosticadas gestantes ou tiveram perda embrionária/fetal foram reutilizadas em subseqüentes protocolos de sincronização. O protocolo consistiu na inserção de um implante intravaginal de progesterona (1,0 g de P4; Sincrogest; Ouro Fino Saúde Animal) e injeção intramuscular de benzoato de estradiol (2 mg IM; Sincrodiol; Ouro Fino Saúde Animal) no início do protocolo (dia 0 = D0). Oito dias depois (D8), o implante intravaginal de progesterona foi retirado e uma dose de análogo de prostaglandina F2a foi administrada por via intramuscular (500 ug de cloprostenol sódico; Sincrocio; Ouro Fino Saúde Animal). A indução da ovulação foi realizada pela administração de benzoato de estradiol (2 mg; Sincrodiol; Ouro Fino Saúde Animal) no D9, e a ocorrência de ovulação confirmada após 42 horas por exame ultrassonográfico transretal. A TE foi realizada sete dias após a ovulação, sendo o embrião transferido no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL).

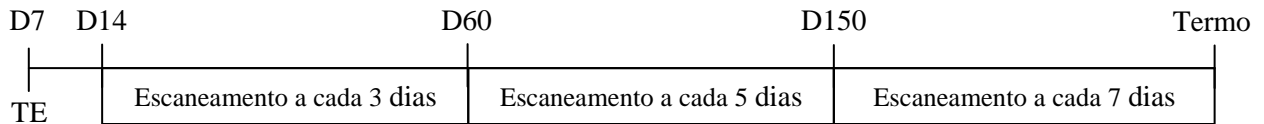
Figura 1. Protocolo de sincronização do estro e da ovulação em receptoras de embriões.



5.1.4. Coleta das imagens ultrassonográficas

Vacas receptoras foram examinadas por ultrassonografia transretal em modos B- e Doppler utilizando o equipamento MyLab 70 Vet Gold (Esaote Healthcare, Itália) equipado com um transdutor multifrequencial linear transretal para uso em grandes animais (LV513 Esaote Healthcare, Itália). Os exames ultrassonográficos foram iniciados no dia 14 após ovulação da receptora (sete dias após a TE) e continuaram até a regressão do corpo lúteo, morte embrionária/fetal ou o termo. Eles eram realizados a cada 3 dias do dia 14 ao dia 60, a cada 5 dias do dia 60 ao dia 150 e semanalmente do dia 150 ao termo, como esquematizado na Figura 2. Foram registrados vídeos dos exames por ultrassonografia transretal em modos B- e Doppler dos ovários, útero e concepto. Os exames compreendiam um monitoramento detalhado das alterações morfológicas e vasculares. Para isso, o útero era examinado cautelosamente em toda a sua extensão pelo modo B. Logo em seguida, ambos os cornos uterinos eram examinado pelo modo Doppler em sua porção medial. Se a vesícula embrionária era detectada, a mesma metodologia de exame descrita para o útero era repetida em toda sua extensão. Atenção especial foi dada ao embrião quando este estava presente. Depois de finalizados os exames na região uterina, ambos os ovários passavam pela metodologia de exame descrita, mas com especial atenção para o exame detalhado do corpo lúteo.

Figura 2. Esquema para coletas dos dados ultrassonográficos. Embriões clonados por SCNT foram transferidos para receptoras no dia 7 após a ovulação (D7). Exames ultrassonográficos foram realizados a cada 3 dias de D14-60, a cada 5 dias de D60-150 e semanalmente a partir D150 até o termo.



5.1.5. Coleta dos dados nos vídeos ultrassonográficos

Os vídeos gravado no exame ultrassonográfico à campo foram utilizados para a coleta de dados com a utilização do software Mylab Desk (Esaote Healthcare, Itália). Imagens dos ovários foram usadas para mensuração do tamanho CL (diâmetro e área) em modo-B, e vascularização (% dos sinais coloridos em tecido luteínico) em modo Doppler colorido. Cada corno uterino foi escaneado individualmente para detectar as estruturas do conceito, como líquidos, membranas e embrião propriamente dito. Em estágios mais avançados da prenhez, os vídeos foram utilizados para a detecção de placentônios. Perda embrionária/fetal foi definida como um embrião ou feto sem batimentos cardíacos.

5.1.6. Análise dos dados

Os dados deste estudo foram examinados de forma descritiva. O estabelecimento de prenhez foi definido pela manutenção da função luteal após o tempo de luteólise fisiológica e pela presença do conceito. As perdas de prenhez foram distribuídas de acordo com períodos gestacionais definidos com base em fases importantes do desenvolvimento fisiológico da gestação, sendo eles: (1) entre os dias 25 a 29, período após o reconhecimento da gestação e que corresponde à visualização ultrassonográfica do conceito com o embrião apresentando batimentos cardíacos; (2) entre os dias 30 a 39, período o qual o alantocórcion se desenvolve

ocupando ambos os cornos uterinos; (3) entre os dias 40 a 59, período que corresponde à finalização do processo de placentação e formação dos placentônios; (4) entre os dias 60 a 149, período do remodelamento e desenvolvimento placentário inicial; (5) entre os dias 150 a 179, início da fase de crescimento exponencial fetal; (6) entre os dias 180-249, período da mais elevada taxa de crescimento fetal e aumento da exigência funcional da placenta, e; (7) entre os dias 250 ao termo, representando o último mês de gestação quando ocorrem as alterações preparatórias para o parto.

5.2. ESTUDO 2

5.2.1. Animais

Oitenta vacas mestiças e Nelores (*Bos taurus indicus*) sem anormalidades aparentes do trato reprodutivo foram utilizadas como receptoras de embriões em vinte e dois protocolos de TETF (transferência de embrião em tempo fixo). Este estudo foi realizado de janeiro de 2013 a outubro de 2015 na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, Pirassununga, São Paulo, Brasil. As vacas foram mantidas em pastagens de *Panicum maximum* (variedade Mombaça) com acesso *ad libitum* a sal mineral e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) - Ministério da Ciência e Tecnologia e pelo Comitê de Ética para Uso Animal e Experimentação (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP).

5.2.2. Produção de embriões clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT)

Ovários provenientes de vacas oriundas de abatedouro foram utilizados para a obtenção de oócitos. Folículos ovarianos com diâmetro de 3 a 8 mm foram aspirados. Os complexos cumulus oócito (COC) recuperados, com mais de quatro camadas de células do

cumulus e citoplasma homogêneo, foram selecionados para a maturação *in vitro* (IVM), segundo técnica previamente descrita (SANGALLI et al., 2012).

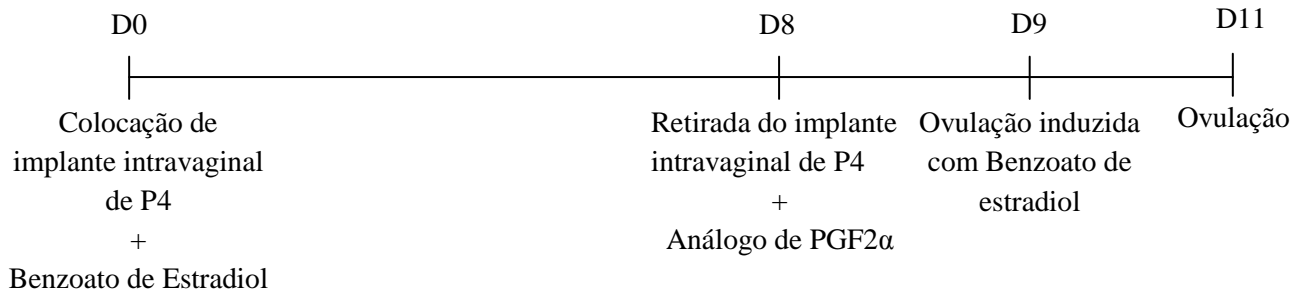
Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados a 38,8 °C, humidade máxima do ar e 5% de CO₂. Fibroblastos da pele de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) foram utilizados como células doadoras de núcleo. As células doadoras foram mantidas numa solução de 0,5% de soro fetal bovino durante 72 h antes da micromanipulação, a fim de sincronizar a fase do ciclo da célula para G1/G0. A IVM, enucleação do oócito, reconstrução do embrião, e ativação do embrião foram realizados seguindo a rotina do laboratório de clonagem previamente descrita (SANGALLI et al., 2012).

Os embriões foram mantidos em micro gotas com 100 uL de meio SOFaa suplementado com 5 mg mL⁻¹ de BSA sem ácidos gordos, e 2,5% (v/v) de FBS sobreposta com óleo mineral. Grupos de 20 embriões foram mantidos no mesmo meio por 7 dias até o estágio de blastocisto (SANGALLI et al., 2012). Blastocistos com sete dias de desenvolvimento derivados da clonagem por SCNT foram então individualizados, envasados em palhetas de 0,25 mL e transferidos para receptoras bovinas sete dias pós-ovulação pelo procedimento não cirúrgico de transferência de embriões.

5.2.3. Sincronização do estro e da ovulação

As receptoras de embriões foram submetidas ao protocolo de sincronização do estro e da ovulação em tempo fixo segundo protocolo detalhado na Figura 1. Aquelas que não responderam ao protocolo, que não foram diagnosticadas gestantes ou tiveram perda embrionária/fetal foram reutilizadas em subsequentes protocolos de sincronização. Implante intravaginal de P4 (1,0 g de P4; Sincrogest; Ouro Fino Saúde Animal) somado a uma injeção intramuscular de benzoato de estradiol (2 mg; Sincrodiol; Ouro Fino Saúde Animal) foram aplicados no primeiro dia do protocolo (D0). Oito dias após (D8), o implante intravaginal de P4 foi retirado e uma dose de análogo de prostaglandina F2 α (500 μ g de cloprostenol sódico) foi administrada via intramuscular. A indução da ovulação foi realizada um dia após a retirada do implante de P4 (D9) com administração intramuscular de benzoato de estradiol (2 mg; Sincrodiol; Ouro Fino Saúde Animal), sendo a ovulação prevista para ocorrer em média 42 horas após a indução. A ovulação foi confirmada pela presença do corpo lúteo ativo por meio de exame ultrassonográfico nos modos B-mode e color-Doppler, as transferências de embriões foram realizadas sete dias após a ovulação.

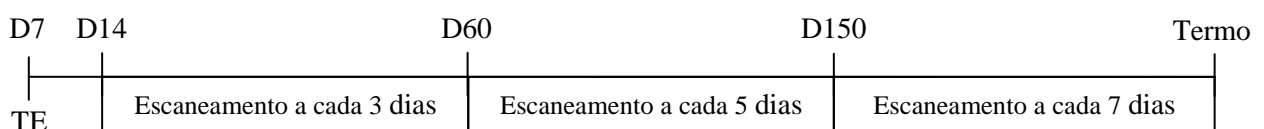
Figura 1. Protocolo de sincronização do estro e da ovulação em receptoras de embriões.



5.2.4. Coleta e análise dos dados ultrassonográficos

As receptoras foram examinadas por ultrassonografia transretal em modos B- e Doppler utilizando o equipamento MyLab 70 Vet Gold (Esaote Healthcare, Itália) equipado com um transdutor multifrequencial linear transretal para uso em grandes animais (LV513 Esaote Healthcare, Itália). Os exames ultrassonográficos foram iniciados no dia 14 após ovulação da receptora (sete dias após a TE) e continuaram até a regressão do corpo lúteo, morte embrionária/fetal ou o termo. Eles eram realizados a cada 3 dias do dia 14 ao dia 60, a cada 5 dias do dia 60 ao dia 150 e semanalmente do dia 150 ao termo, como esquematizado na Figura 2.

Figura 2. Esquema para coletas dos dados ultrassonográficos. Embriões clonados por SCNT foram transferidos para receptoras no dia 7 após a ovulação (D7). Exames ultrassonográficos foram realizados a cada 3 dias de D14-60, a cada 5 dias de D60-150 e semanalmente a partir D150 até o termo.



As gestações foram acompanhadas por ultrassonografia nos modos B e Doppler e os exames gravados em vídeos para posterior análise. O estabelecimento de prenhez foi definido pela manutenção da função luteal após o tempo de luteólise fisiológica. A funcionalidade do CL foi avaliada por ultrassonografia no modo Doppler colorido, sendo considerado em luteólise o CL com menos de 30% de sinal de vascularização no tecido luteal e área menor que 2 cm². As vacas que mantiveram o CL ativo eram mantidas em exames periódicos conforme previamente definido (figura 2). A presença no útero da vesícula embrionária, embrião (EP = embryo proper) e batimentos cardíacos eram minuciosamente examinados. A detecção de batimentos cardíacos era realizada por ultrassonografia no modo Doppler colorido, localizando sinais coloridos pulsantes na região cardíaca do embrião. A definição dos fenótipos gestacionais foi baseada na análise minuciosa dos vídeos dos escaneamentos ultrassonográficos do útero e ovários de vacas receptoras de embriões clonados.

Os dados deste estudo foram examinados de forma descritiva.

6. RESULTADOS

6.1. ESTUDO 1

Oitenta vacas receptoras foram utilizadas em 22 repetições de protocolos de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Os critérios de reutilização da mesma vaca nas repetições dos protocolos foram previamente definidos. A taxa geral de ovulação considerando todos os protocolos foi de 68,48% (247/361). A variação da taxa de ovulação entre os protocolos TETF foi elevada, variando de 0 a 100%, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Número de vacas utilizadas e ovuladas e taxas de ovulação (%) por protocolo de TETF e geral.

Protocolo de sincronização	Número de vacas utilizadas	Número de vacas ovuladas	Taxa de ovulação (%)
1	10	9	90.0
2	10	6	60.0
3	11	8	72.7
4	11	0	0.0
5	10	10	100.0
6	10	6	60.0
7	10	5	50.0
8	15	6	40.0
9	25	8	32.0
10	28	16	57.1
11	28	20	71.4
12	22	9	40.9
13	15	9	60.0
14	15	12	80.0
15	16	16	100.0
16	20	17	85.0
17	15	15	100.0
18	16	15	93.8
19	20	17	85.0
20	23	18	78.3
21	16	15	93.8
22	15	10	66.7
Total	361	247	68.4

Duzentos e quinze blastocistos bovinos clonados por SCNT foram produzidos e transferidos para receptoras no dia 7 (dia 0 = ovulação). Todas as receptoras gestantes tiveram o seu diagnóstico entre os dias 25-35, sendo a taxa de prenhez de 13,95% (30/215). A variação das taxas de prenhez entre as repetições também foi elevada e variou de 0 a 42,86%, como mostrado na tabela 2. Em seis repetições nenhuma prenhez foi detectada, ao passo que em três delas a taxa de prenhez foi igual ou superior a 40%.

Tabela 2. Resultados de protocolos de sincronização do estro e ovulação para transferência de embriões clones por SCNT.

Protocolo de sincronização	Número de vacas ovuladas	Número de embriões transferidos	Número vacas gestantes no dia 35 após OV	Taxa de prenhez no dia 25 (%)
1	9	9	1	11.1
2	6	5	2	40.0
3	8	7	3	42.9
4	0	0	0	0.0
5	10	10	2	20.0
6	6	6	1	16.7
7	5	5	1	20.0
8	6	6	0	0.0
9	8	7	1	14.3
10	16	15	1	6.7
11	20	11	2	18.2
12	9	9	0	0.0
13	9	9	1	11.1
14	12	10	1	10.0
15	16	8	0	0.0
16	17	15	0	0.0
17	15	15	0	0.0
18	15	12	3	25.0
19	17	17	2	11.8
20	18	17	1	5.9
21	15	14	6	42.9
22	10	8	2	25.0
Total	247	215	30	13.9

Conforme previamente definido, as taxas de prenhez foram agrupadas por períodos gestacionais de acordo com sua importância fisiológica. Uma diminuição contínua nas taxas de gestação foi observada com o avanço dos estágios da prenhez (Tabela 3). Até o dia 25 de gestação, 30 gestações foram detectadas em 215 receptoras de embriões clonados por SCNT. Esse número corresponde a uma taxa de prenhez de 13,95 %. Vale ser ressaltado que somente duas gestações chegaram a termo, o que corresponde a 6,67 % (2/30) das prenhez detectadas até o dia 25. Quando calculada sobre o número de embriões transferidos, a taxa de prenhez foi de 0,93% (2/215).

Tabela 3. Taxas de prenhez (%) por períodos gestacionais até o termo após transferência de embriões bovinos clonados por SCNT.

Período gestacional (dias)	Número de gestações	Taxa de Prenhez (%)	
Até 25	30	13.9	(30/215)
25 a 29	28	13.0	(28/215)
30 a 39	20	9.3	(20/215)
40 a 59	14	6.5	(14/215)
60 a 149	10	4.6	(10/215)
150 a 179	7	3.3	(7/215)
180 a 249	4	1.9	(4/215)
250 ao termo	2	0.9	(2/215)
Total de embriões transferidos	215	-	-

As perdas gestacionais por períodos são apresentadas na tabela 4, sendo elas calculadas sobre o total de prenhez detectadas e também sobre o número de prenhez existentes no período anterior ao cálculo. As maiores taxas de perda gestacional ocorreram entre os dias 30 a 40 (26,67%) e entre os dias 40 a 60 (20,00%), quando elas foram calculadas com base no total de receptoras que ficaram gestantes. No entanto, quando as taxas de perda gestacional foram calculadas com base no número de receptoras gestantes no período anterior, nota-se que uma taxa constante em torno de 30 % entre cada período. Os dois últimos períodos (180 a 249 e 249 ao termo) apresentaram uma taxa de perda gestacional de 42,86 e

50,00 %, respectivamente. Apesar do valor elevado em relação aos períodos anteriores, vale ser ressaltado que o número de gestações em andamento nestes dois últimos períodos foi muito pequeno, sete e quatro respectivamente.

Tabela 4. Taxas de perdas gestacionais (%) por períodos gestacionais até o termo após transferência de embriões bovinos clonados por SCNT. As taxas foram calculadas em relação ao total de receptoras gestantes no dia 25 e em relação ao total de prenhez mantidas no período anterior.

Período gestacional (dias)	Perdas gestacionais (%)			
	Em relação ao total de receptoras gestantes no dia 25		Em relação ao total de prenhez mantidas no período anterior	
25 a 29	6.7	(2/30)	6.7	(2/30)
30 a 39	26.7	(8/30)	28.6	(8/28)
40 a 59	20.0	(6/30)	30.0	(6/20)
60 a 149	13.3	(4/30)	28.6	(4/14)
150 a 179	10.0	(3/30)	30.0	(3/10)
180 a 249	10.0	(3/30)	42.9	(3/7)
250 ao termo	6.7	(2/30)	50.0	(2/4)
Total de prenhez no dia 25	30	-	-	-

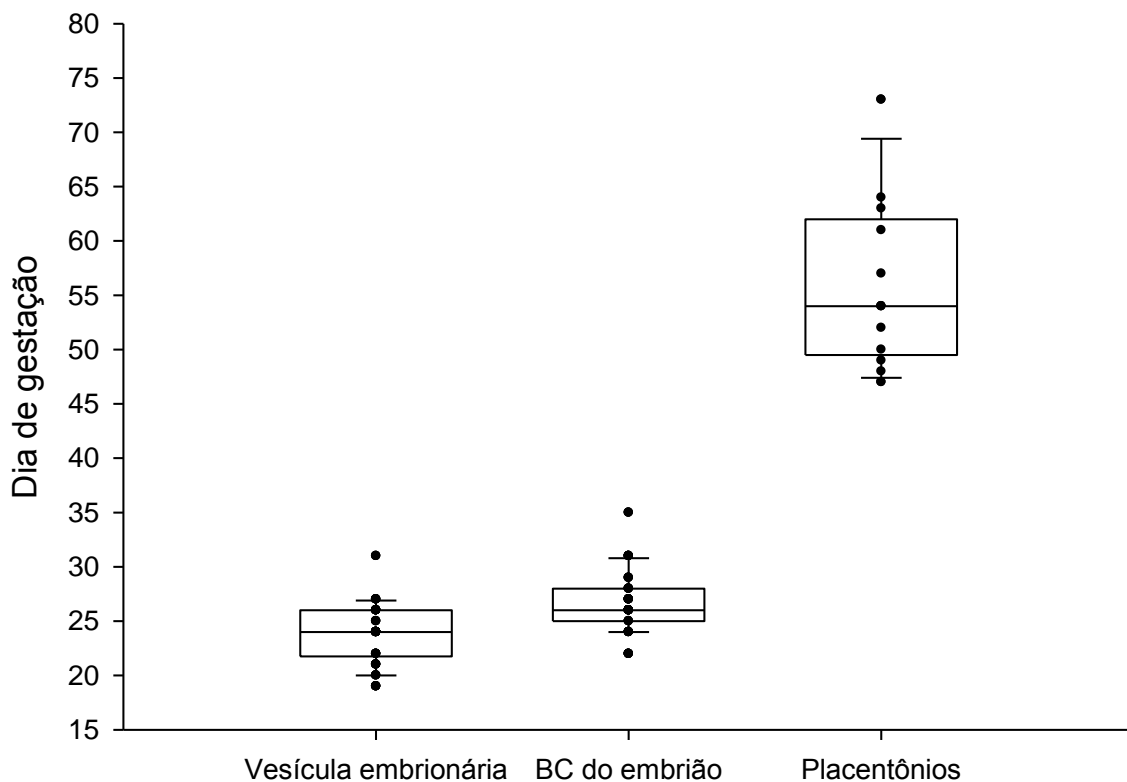
Os dias gestacionais para as primeiras detecções de vesícula embrionária, embrião com batimento cardíaco, placentônios e morte fetal em receptoras de embriões clonados por SCNT são mostrados na tabela 5. A vesícula embrionária foi detectada pela primeira vez em média no dia $23,7 \pm 0,5$ (variação: 19-31 dias) e o batimento cardíaco do embrião em média no dia $26,6 \pm 0,5$ (variação: 22-31 dias). Não foi detectada a formação de placentônios em 17 receptoras devido à ocorrência de perdas gestacionais antes da data prevista de formação destes, no entanto, em receptoras que ultrapassam a formação dos placentônios o dia médio da primeira detecção dos placentônios foi de $55,9 \pm 2,1$ (variação: 47-73 dias).

Tabela 5. Dias da primeira detecção da vesícula embrionária, batimentos cardíacos, embrião propriamente dito (EP), placentônios e morte fetal por ultrassonografia das prenhez derivadas de SCNT.

Dia da primeira detecção por ultrassonografia em modos B- e Doppler				
Clone #	Vesícula embrionária	Batimentos cardíacos	Placentônios	Morte embrionária ou fetal
1	21	22	Não detectado	31
2	26	27	Não detectado	67
3	24	35	47	152
4	24	24	57	79
5	20	26	64	71
6	26	31	Não detectado	35
7	24	26	54	136
8	25	25	Não detectado	52
9	25	25	52	167
10	24	24	54	195
11	24	24	Não detectado	32
12	22	28	Não detectado	31
13	19	26	73	212
14	26	26	Não detectado	31
15	24	26	49	Nascido vivo
16	27	27	Não detectado	32
17	21	26	61	212
18	22	26	Não detectado	34
19	26	29	48	167
20	22	27	Não detectado	33
21	20	26	50	251
22	21	24	Não detectado	37
23	19	22	Não detectado	43
24	24	27	Não detectado	29
25	24	28	54	Nascido vivo
26	27	29	Não detectado	36
27	24	26	Não detectado	45
28	26	26	Não detectado	40
29	31	31	Não detectado	43
30	24	28	63	228
Média	23.7	26.6	55.9	90.0
SEM	0.5	0.5	2.1	14.1

Os dados de primeira detecção da vesícula embrionária, do batimento cardíaco do embrião e dos placentônios apresentados na tabela 5 são mostrados na figura 3 na forma de “boxplot” juntamente com a distribuição individual dos dados. Pode ser observado na figura 3 que um dos dados se encontra acima do desvio e também um dos dados abaixo do desvio para os três parâmetros estudados, indicando atraso ou precocidade do desenvolvimento destas características estudadas. Vale ressaltar que, com base nos dados apresentados por indivíduo na tabela 5, o atraso ou precocidade aqui detectado não está se repetindo no mesmo indivíduo para todas as características avaliadas.

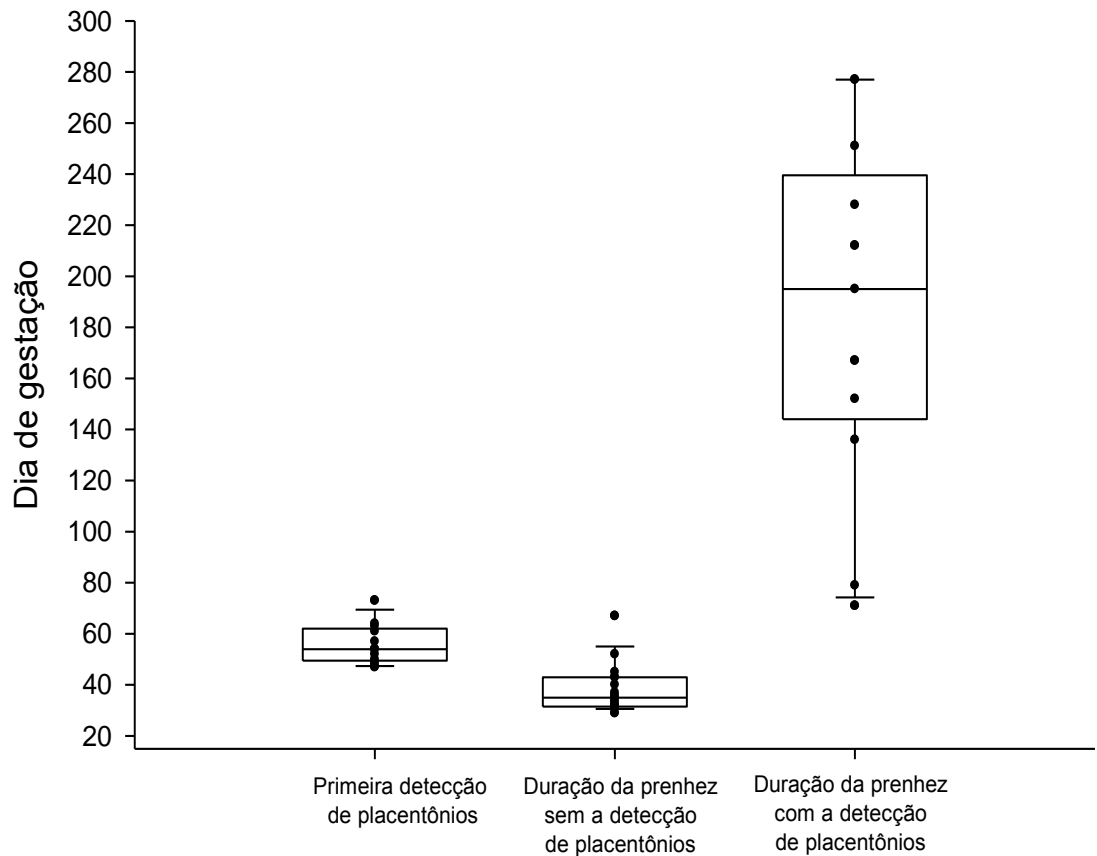
Figura 3. Distribuição em “boxplot” dos dias das primeiras detecções da vesícula embrionária, do batimento cardíaco (BC) do embrião e dos placentônios.



A figura 4 mostra a distribuição em “boxplot” do dia da primeira detecção de placentônios e da duração das gestações dos animais que apresentaram ou não placentônios. As receptoras que desenvolveram placentônios tiveram suas gestações prolongadas atingindo a média de $186,5 \pm 18,4$ dias (variação: 71-277 dias). A duração média das gestações em

receptoras que não tiveram placentônios detectados foi de $38,29 \pm 2,34$ dias (intervalo: 29-67 dias). As mortes fetais ocorreram em média no dia $90,0 \pm 14,1$ (variação: 29-251 dias). Duas receptoras atingiram o termo e realizou-se o parto por cesariana no dia 277, resultando em dois recém-nascidos vivos.

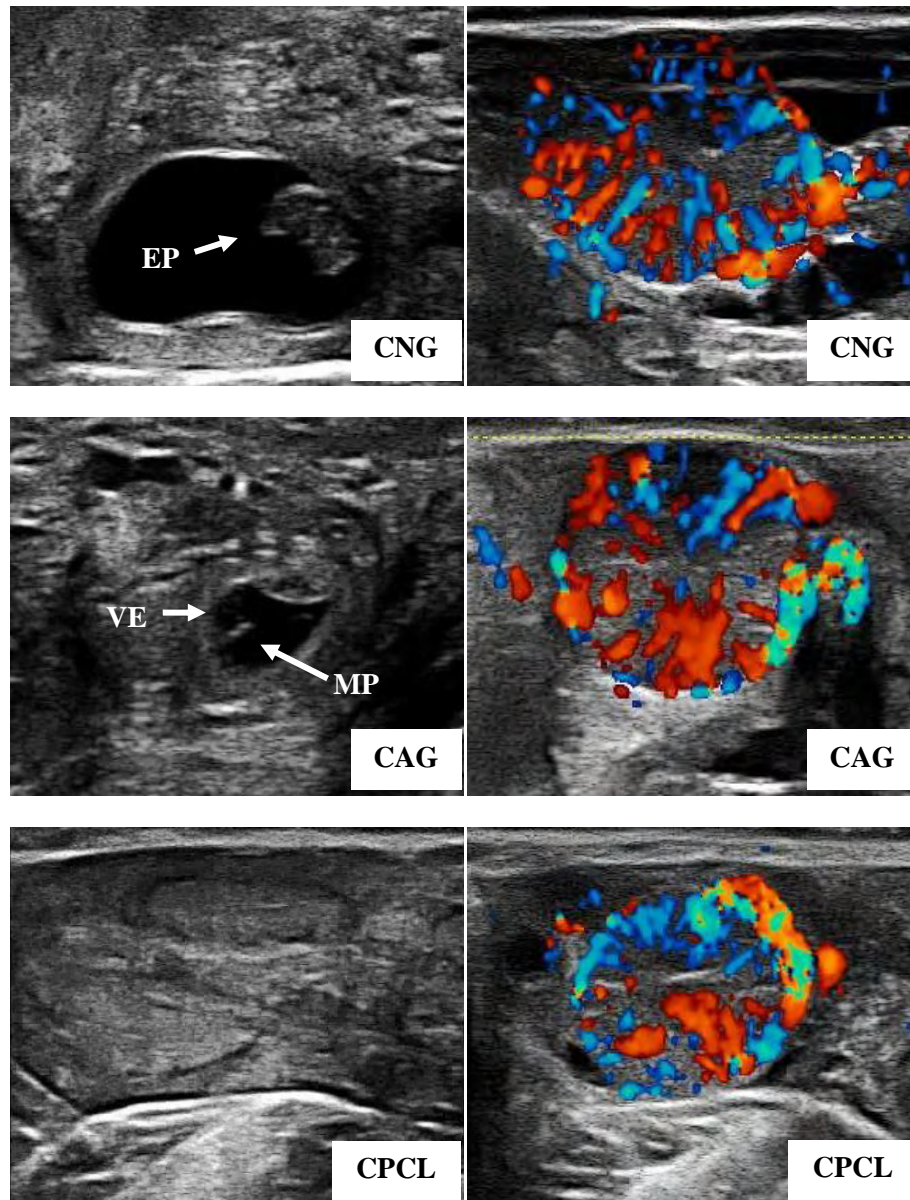
Figura 4. Distribuição em “boxplot” do dia da primeira detecção de placentônios e da duração das gestações dos animais que apresentaram ou não placentônios.



6.2. ESTUDO 2

Três apresentações gestacionais de embriões clonados por SCNT, nas quais as receptoras mantiveram o corpo lúteo ativo após a fase de luteólise, foram encontradas durante o desenvolvimento deste estudo. Com base em aspectos ultrassonográficos do útero e ovários das receptoras, as três apresentações foram classificadas em: (1) gestação normal de clone (CNG), (2) gestação anembrionada de clone (CAG) e (3) receptora de clone com corpo lúteo persistente (CPCL). A definição dos fenótipos baseou-se nas análises dos vídeos e imagens dos escaneamentos ultrassonográficos do útero e ovários de vacas receptoras de embriões clonados. Os parâmetros avaliados para a definição final do fenótipo foram: presença de corpo lúteo ativo, presença de anexos placentários (vesícula embrionária) e presença do embrião propriamente dito com batimento cardíaco. A Figura 3 mostra exemplos dos três fenótipos acima descritos através de imagens ultrassonográficas das respectivas vesículas embrionárias e corpos lúteos.

Figura 3. Ultrassonogramas do útero e CL em receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT. As das três apresentações gestacionais são exemplificadas, sendo: CNG = gestações normais de clone, CAG = gestações anembrionadas de clone e CPCL = receptora de clone com CL persistente. As imagens acima foram coletadas de receptoras entre os dias 30 aos 33 dias após a ovulação. Os ultrassonogramas da esquerda foram coletados por ultrassonografia em modo-B no corno uterino ipsilateral ao CL e os da direita foram coletados por ultrassonografia em modo-Doppler colorido no CL. Pontos coloridos nos ultrassonogramas de CL representam fluxo sanguíneo. Setas brancas indicam estruturas importantes utilizadas na caracterizam dos fenótipos gestacionais. EP: embrião; VE: vesícula embrionária; MP: membranas placentárias.



A incidência desses três tipos de fenótipos gestacionais após a transferência de embriões bovinos clonados por SCNT encontrada neste estudo é mostrada na Tabela 1. Duzentos e quinze embriões foram transferidos, sendo obtidas aos 25 dias de gestação 30 gestações normais (CNG = 13,95%; 30/215), 13 gestações anembrionadas (CAG = 6,05%; 13/215) e 16 receptoras com CL persistente (CPCL = 7,44%; 16/215).

Tabela 1. Incidência dos três fenótipos gestacionais encontrados em receptoras de clones bovinos produzidos por SCNT. O número total de animais utilizados em protocolos de sincronização, a taxa de ovulação no final dos protocolos, o número de embriões clonados transferidos e o número de receptoras de embriões clonados avaliadas e caracterizadas em cada um dos três fenótipos gestacionais aos 25 dias de gestação são mostrados.

Nº de animais protocolados	Taxa de ovulação	Nº de embriões transferidos	Gestações normais CNG	Gestações anembrionadas CAG	Receptoras com CL persistente CPCL
361	68,48% (247/361)	215	13,95% (30/215)	6,05% (13/215)	7,44% (16/215)

Nas gestações normais de clones (CNG) foi possível detectar sinais da vesícula embrionária a partir do dia 25 de gestação, presença de anexos placentários, embrião com batimento cardíaco e corpo lúteo ativo. No grupo CPCL, 16 receptoras apresentaram somente corpo lúteo persistente, ou seja, CL ativo por mais de 25 dias sem detecção de membranas e líquidos placentários. Em alguns exames ultrassonográficos nestas receptoras foi possível detectar uma linha hiperecogênica no lúmen uterino, mas sem presença de líquido, sendo um possível sinal da presença de membranas fetais. Em outros exames, uma quantidade ínfima de líquido foi detectada no lúmen uterino, mas não foi observado o desenvolvimento da vesícula embrionária, nem a presença de membranas fetais. Outras 13 receptoras apresentaram corpos lúteos persistentes e também a presença da vesícula embrionária em desenvolvimento, de forma semelhante às aquelas do grupo CNG, com presença significativa de líquidos e sinais de membranas do concepto neste líquido. No entanto, em nenhum momento o embrião foi localizado, sendo estas gestações denominadas de gestações anembrionadas (CAG).

Em média, a luteólise no grupo de receptoras CPCL aconteceu no dia 38.3 ± 2.2 , variando dos 25 aos 59 dias, no grupo de gestações anembrionadas (CAG), no dia 48.0 ± 7.7 , variando dos 28 aos 108 dias.

Considerando os três fenótipos gestacionais encontrados, o número total de receptoras de embriões que mantiveram o CL ativo após o período de luteólise fisiológica foi de 59. Esse valor corresponde a 27.4% (59/215) de taxa de prenhez se este tivesse sido o critério para diagnóstico positivo da gestação.

7. DISCUSSÃO

7.1. ESTUDO 1

No presente estudo é reafirmada a baixa eficiência da técnica de clonagem bovina por SCNT. Os resultados apresentados são piores àqueles descritos na literatura. Em 215 transferências de embriões clonados por SCNT, trinta receptoras foram diagnosticadas gestantes e somente duas gestações chegaram a termo, o que equivale a uma taxa prenhez e de nascimento de aproximadamente 14% e 1%, respectivamente. Têm sido relatadas na literatura taxas de nascimento de bezerras vivos variando de 7 a 10% do total de embriões transferidos (Wells et al. 1999; Merighe 2007). A baixa taxa de nascimento apresentada pode estar relacionada a fatores ambientais adversos que acometeram a região e período de desenvolvimento deste estudo. Durante os quase dois anos deste estudo, todas as estações climáticas apresentaram baixa pluviosidade e temperaturas elevadas, dificultando a obtenção e o fornecimento de alimento de boa qualidade às receptoras, além do possível aumento do estresse ambiental nesses animais. Fatores ambientais e nutricionais adversos têm sido relatados na literatura como sendo prejudiciais à fertilidade (Spell et al. 2001; Santos et al. 2004; Jones & Lamb 2008). Os efeitos ambientais adversos podem ter sido também responsáveis pelas variadas taxas de ovulação obtidas entre os protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação. A taxa média de ovulação das receptoras de embriões foi de 68,5%, com variação entre 0 a 100% entre protocolos. Apesar dos dados climáticos não terem sido aferidos e registrados durante o estudo, acredita-se que a variação das taxas de ovulação entre protocolos esteja relacionada com o clima (Spell et al. 2001; Jones & Lamb 2008). Este fato foi um grande limitante, já que as baixas taxas de ovulação resultaram em um menor número de receptoras aptas para receber os embriões clonados disponíveis.

As variações nas taxas de prenhez encontradas neste estudo, de 0 a 43% entre os protocolos de TE realizados, podem ter sido influenciadas por diversos fatores, sendo um deles as variações climáticas sobre as vacas doadoras de oócitos. Além das alterações epigenéticas causadas pelo processo de clonagem por SCNT que sabidamente afetam o desenvolvimento do embrião (Hiendleder et al. 2004; Loi et al. 2007; Niemann et al. 2008; Dean et al. 2001; Kang et al. 2001), podemos sugerir que as variações das taxas de prenhez

possam também estar atreladas à qualidade dos oócitos utilizados para a transferência de núcleos. Os oócitos utilizados neste estudo eram provenientes de fêmeas oriundas de abatedouro, sem identificação de origem, estatus nutricional, idade ou raça. Além disso, as fêmeas doadoras de oócito estavam também sujeitas às variações climáticas adversas previamente discutidas. Os aspectos relacionados à qualidade oocitária têm sido revisados por Moussa et al. (2015).

Rotineiramente, o diagnóstico de gestação em sistemas de produção de bovinos é realizado aos 30-35 dias de gestação. No entanto, Kastelic et al. (1988) reportaram que no dia 11 é possível identificar vesículas embrionárias no lúmen uterino por ultrassonografia, sendo 73% delas ainda eram esféricas e 23% já se apresentando oblongas. No entanto, após aproximadamente seis dias de permanência no útero, a vesícula embrionária esférica alonga-se assumindo um formato tubular no lúmen uterino e dificultando o diagnóstico. Outro grupo relata que diagnósticos de gestação podem ser feitos por ultrassonografia transretal com precisão desde o dia 26 pós-ovulação (Pierson & Ginther, 1984). O diagnóstico de gestação precoce pode fornecer informações científicas importantes sobre o desenvolvimento do conceito e perdas gestacionais precoces muitas vezes não diagnosticadas quando pesquisadas tardiamente. Os exames ultrassonográficos do presente estudo foram iniciados aos 14 dias pós-ovulação da receptora e a detecção de dois parâmetros foram utilizados para o diagnóstico positivo de prenhez, a manutenção do CL após o período de luteólise fisiológica (dia 18 a 20 pós-ovulação) e a detecção da vesícula preenchida por fluido (conceito) com o embrião apresentando batimentos cardíacos. Os dados coletados são indicativos de desenvolvimento retardado do conceito bovino oriundo de embriões clonados por SCNT. Comparando as gestações derivadas de embriões clonados por SCNT deste estudo com informações da literatura de novilhas gestantes concebidas naturalmente (Curran et al, 1986a; 1986b, Silva & Ginther, 2010), nota-se um atraso de desenvolvimento nos conceitos clonados, ou seja, a primeira detecção da vesícula embrionária ocorreu aos 24 dias em clones vs 20 dias em prenhezes naturais, o batimento cardíaco do embrião aos 27 dias vs 21 e os primeiros placentônios aos 55 dias vs 35 dias. Os dados apresentados indicam um atraso no desenvolvimento dos conceitos clonados. Aspectos ultrassonográficos do desenvolvimento da gestação bovina em prenhezes naturalmente produzidas são encontrados na literatura (Curran et al, 1986a; 1986b). No presente estudo, o primeiro momento de detecção da vesícula embrionária, batimentos cardíacos do embrião, placentônios e da morte do embrião foram mostrados na Tabela 5.

Pode-se concluir que, a maioria dos embriões bovinos clonados por SCNT não ultrapassa a fase inicial da placentação, mas entanto foram capazes de bloquear a luteólise durante o reconhecimento materno da gestação. As perdas gestacionais neste período inicial provavelmente ocorreram por falhas durante o desenvolvimento do alantocódon vascularizado e consequente a não formação dos placentônios, resultando nas elevadas perdas gestacionais observadas. Em relação às perdas gestacionais, dados da literatura mostram que após a transferência do embrião clonado por SCNT são identificados quatro períodos críticos gestacionais: (1) 70% dos embriões são perdidos até o dia 30; (2) 40% dos embriões que ultrapassaram o primeiro mês são perdidos até o dia 60; (3) 50% das gestações mantidas após o dia 60 são perdidas durante o terceiro trimestre de gestação; (4) 25% das prenhez mantidas no terceiro trimestre de gestação são perdidas anteriormente ao termo. Essas perdas gestacionais podem estar relacionadas com uma ineficiente sinalização do embrião para o reconhecimento materno da gestação, baixo estímulo do remodelamento uterino pelo embrião, alterações imunológicas, reduzido número de cotilédones, camadas espessas e edematosas da placenta, hidroalantoide, hipertrofia de cotilédones, edema na área intercotiledonária e/ou anasarca fetal (Merighe 2007; Stice et al. 1996; Hill et al. 2000; Edwards et al. 2003). Neste estudo, 83% dos embriões transferidos foram perdidos até o dia 30 de gestação. No entanto, duas gestações foram detectadas e perdidas antes do dia 30, demonstrando a importância do diagnóstico precoce da gestação para fins científicos.

Com base na literatura, entre o dia 20 aos 30 de gestação, ocorre o início da formação do alantocódon na porção do concepto no corno uterino ipsilateral ao CL, sendo o concepto visualizado por ultrassonografia como uma vesícula preenchida de fluido (Silva & Ginther, 2010). Do dia 30 aos 60, a perda gestacional neste estudo foi de 50%, também um pouco acima do relatado na literatura. Placentônios primordiais com microvilos, tênue adesão entre o epitélio materno e fetal e um sistema vascular primitivo são detectados em torno do Dia 32 de gestação. Após o primeiro mês de gestação, a placentação continua com as carúnculas induzindo a hipertrofia e hiperplasia dos vilos cotilédonários, formando maiores e mais complexos placentônios em torno do Dia 40 (King et al. 1979; Schlafer et al. 2000). Em gestações naturalmente produzidas, as maiores taxas de perda gestacional também são observadas durante os dois primeiros meses de gestação, exatamente durante o período de intensas alterações vasculares e arquiteturais uteroplacentárias. Tem sido relatado que, considerando toda a gestação, as perdas embrionárias e fetais precoces (até 60 dias de gestação) podem atingir até 50% dos embriões transferidos artificialmente (Drost et al. 1999,

Sartori et al. 2003). Entre os Dias 21 aos 45, a taxa de perda embrionária varia de 10 a 21% (Moreira et al. 2001, Chebel et al. 2003, Chebel et al. 2004). As maiores taxas de perda gestacional observadas neste estudo ocorreram respectivamente nos períodos de 30 a 39 dias e de 40 a 59 dias de gestação. Como comentado acima, os períodos de desenvolvimento do alantocórcion vascularizado e do desenvolvimento inicial da placentação mostram-se serem críticos para a sobrevivência do conceito em prenhez derivadas de clonagem por SCNT..

Quando as perdas gestacionais são consideradas em relação ao total de prenhez mantidas no período anterior de análise, foi observada uma queda por período que variou de aproximadamente 30 a 50%. Esse dado nos mostra que as perdas gestacionais ocorrem de forma relativamente constante e elevada durante toda a gestação de clones bovinos produzidos por SCNT. Em termos numéricos, maior número de perdas ocorreu nos períodos anteriores à placentação. Neste estudo, ocorreu uma redução gradativa no número de gestações durante os nove meses e meio gestacionais, fato que limitou o número de gestações em períodos finais para análises mais detalhadas. Vale ressaltar que após a placentação inicial, o remodelamento da vascularização materno-placentária é contínuo e suporta o aumento gradual das demandas fetais para o transporte de nutrientes, gases respiratórios e excretas durante o seu crescimento (Reynolds et al. 2006; Torry et al. 2007). O primeiro aumento da exigência nutricional fetal começa por volta do dia 90 pós-cobertura (Ferrel 1980). Por fim, o último trimestre da gestação é caracterizado por intenso crescimento fetal e paralelo aumento das trocas transplacentárias de nutrientes, gases e excreções (Reynolds et al. 1986; Reynolds et al. 2006). Portanto, os presentes dados sugerem fortemente que os períodos de formação do alantocórcion e dos placentônios são críticos para o desenvolvimento do conceito produzido por SCNT e determinantes para a ocorrência das perdas gestacionais.

Os dados de perdas gestacionais por períodos aqui mostrados também sugerem que as perdas após o período de placentação poderão ocorrer devido a uma dificuldade de remodelamento e adequação placentária às rampantes necessidades de trocas. A causa desse deficiente remodelamento placentário durante a gestação pode estar relacionado a um desenvolvimento placentário inicial inadequado. Tem sido descrito que durante o primeiro trimestre de gestação de clones produzidos por SCNT, as perdas gestacionais são associadas a uma placentação anormal, apresentando um reduzido número de placentônios e inadequada vascularização do saco alantoideano (Wells et al. 1999; Hill et al. 2000). Nesse contexto são sugeridos três diferentes fenótipos de placenta entre os dias 30 e 90 com base em sua

arquitetura: (1) crescimento rudimentar; (2) cotilédones hemorrágicos; e (3) aspecto macroscópico semelhante à prenhez naturalmente concebidas. Tais alterações placentárias são determinantes para a sobrevivência fetal entre os Dias 30 e 90. Antes do Dia 45, placentas oriundas de abortamentos apresentam epitélio coriônico e formação vascular deficiente. Placentas de fetos que sobrevivem até o Dia 50 apresentam melhor desenvolvimento epitelial, entretanto sem a formação de placentônios funcionais, resultando em morte fetal por privação de nutrientes. As placentas que apresentam número suficiente de placentônios para suporte do desenvolvimento fetal são capazes de manter a gestação até o segundo trimestre.

7.2. ESTUDO 2

Pela primeira vez na literatura, três diferentes apresentações gestacionais em receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT são descritas em animais domésticos. Em todos os três fenótipos as receptoras mantiveram o corpo lúteo ativo por um longo período após a fase esperada para a luteólise fisiológica. Este estudo relata a ocorrência de 13 receptoras de embriões clonados que foram diagnosticadas com corpo lúteo persistente e presença de uma saculação uterina exatamente similar à vesícula embrionária, porém o embrião nunca foi localizado, sendo estas gestações denominadas de anembrionadas. Além desse grupo de receptoras, noutro 16 receptoras apresentaram corpo lúteo persistente e ativo por vários dias após a TE e acima do período estimado para luteólise fisiológica, ou seja, um corpo lúteo persistente, mas sem o desenvolvimento da vesícula embrionária e do embrião. Prenhez anembrionadas têm sido descritas em mulheres e associadas a perda gestacional precoce (Johnson et al, 1993; El-Refaey et al, 1992; Petrović et al, 1994). Os achados deste estudo são inéditos na literatura e estimulam questionamentos sobre a embriogênese inicial e o remodelamento uterino nessas gestações, abrindo caminho para novos estudos e gerando um modelo experimental animal para ser comparado aos casos observados em mulheres.

A reprogramação genética do DNA, através da expressão e inibição gênica, além de regular a completa formação do embrião e da placenta durante todo o período gestacional, também participa do desenvolvimento do indivíduo após o seu nascimento até a sua morte (Wolf et al. 2001, Seisenberger et al. 2012, Huan et al, 2015). Alterações epigenéticas de reprogramação gênica têm sido sugeridas como causa da pobre comunicação embrionário-

materna e pelo desenvolvimento incompleto da placenta, resultando em baixas taxas de sobrevivência após o procedimento de SCNT. O perfil de expressão genética das células adultas diferenciadas é abolido e um novo perfil de expressão embrionário deve ser estabelecido para permitir o desenvolvimento do embrião clone (Hiendleder et al. 2004; Loi et al. 2007; Niemann et al. 2008). Alterações da metilação do DNA têm sido encontradas em embriões de clones bovinos produzidos por SCNT e no feto em níveis globais ou gene-específicos (Dean et al. 2001; Kang et al. 2001; Hiendleder et al. 2004). Estas alterações podem ter sido causas da elevada incidência dos fenótipos gestacionais anômalos detectados neste estudo.

As duas apresentações gestacionais anômalas (CAG e CPCL) levantam grandes questionamentos a respeito de sua competência na regulação de fases críticas do desenvolvimento gestacional, como o reconhecimento materno da gestação, a placentação e o remodelamento do complexo útero-placentário-fetal para permitir o desenvolvimento da prenhez até o termo. Provavelmente, essas duas apresentações estão expressando fatores, como o IFN-tau, no momento chave da gestação inicial para bloquear o processo luteolítico de forma semelhante ao observado fisiologicamente em gestações naturalmente produzidas. Ou seja, em algum momento da fase inicial dessas gestações, células trofoblásticas se desenvolveram ao ponto de produzir e secretar IFN-tau no lúmen uterino em quantidades suficientes para realizar o bloqueio da luteólise, permitindo o reconhecimento materno da gestação. Mesmo as receptoras do grupo CPCL, onde nenhuma evidência de vesícula embrionária foi detectada por ultrassonografia, mas somente uma sugestão de presença de algum tecido no lúmen uterino pelas linhas ecogênicas observadas em alguns destes animais, o reconhecimento materno da gestação ocorreu. Dados da literatura indicam que em mulheres a produção de hCG em prenhez anembrionadas é inferior à produção observada em prenhez normais (Johnson et al, 1993). Acreditamos que o limiar de produção de INT-tau permitindo o bloqueio da luteólise foi atingido, no entanto, a capacidade de produção desta substância entre os fenótipos gestacionais de clones aqui descritos e de gestações naturalmente produzidas necessitam de maiores investigações.

Outro aspecto a ser discutido é o fato de células responsáveis por originar o embrião propriamente dito (EP) não se desenvolverem ao ponto do embrião ser detectado por ultrassonografia em ambos os grupos de gestações anômalas. As gestações CPCL apresentaram o CL ativo de 25 a 59 dias de gestação (média de 38.33 ± 2.18 dias). Isso

significa que apesar de não ter ocorrido o desenvolvimento do embrião propriamente dito e dos anexos placentários a ponto de serem vistos por ultrassonografia, provavelmente, ocorreu a formação do trofotoderma, que liberou INF-tau inibindo a luteólise. Algumas dessas gestações não apresentaram qualquer sinal de vesícula ou líquido no útero, enquanto em outras foi detectada a presença ínfima de líquido no útero, podendo significar uma formação mais adiantada dos anexos placentários, porém esse foi o máximo desenvolvimento inicial presente nessas apresentações. As receptoras que apresentaram um pouco mais de desenvolvimento placentário, provavelmente, foram gestações que regrediram o corpo lúteo mais tardiamente, aos 59 dias. Enquanto o inverso também pode ter ocorrido, com regressão mais recente do corpo lúteo nas gestações que tiveram menos desenvolvimento embrionário, não apresentando qualquer sinal de gestação por ultrassonografia.

No caso das prenhez anembrionadas (CAG), da mesma forma que no grupo CPCL, sugere-se que houve desenvolvimento do trofotoderma fetal, produzindo INF-tau, inibindo a luteólise e estimulando o reconhecimento materno da gestação. Além da formação do trofotoderma, a gestação CAG teve desenvolvimento dos anexos placentários, apesar de não ter sido detectada a presença do embrião propriamente dito. A possível explicação para a formação somente das membranas fetais poderia ser as alterações na reprogramação genética que favoreceram o desenvolvimento do trofotoderma dando origem aos anexos placentários, enquanto desfavoreceu o desenvolvimento da massa celular interna que originaria o embrião propriamente dito. Além disso, o grupo CAG apresentou uma variação de sobrevivência entre 28 e 108 dias (48.0 ± 7.74), uma variabilidade muito grande no tempo de vida do CL ativo, 80 dias de diferença entre a receptora que sofreu luteólise mais precoce em relação a mais tardia, o que mostra ser este um grupo muito heterogêneo.

Mesmo na ausência do embrião, os anexos placentários continuaram a se desenvolver e a quantidade de líquido no útero aumentou com o decorrer da gestação. As gestações anembrionadas se mantiveram até o momento em que os anexos placentários poderiam se desenvolver, aparentemente, na independência da presença do embrião propriamente dito. A partir do momento em que ocorre a formação e crescimento da membrana alantocoriônica, a presença do embrião é necessária para o desenvolvimento vascular deste tecido (Greenstein et al. 1958; King et al. 1980; 1981; 1982; Leiser & Kaufmann, 1994) para a manutenção e posterior desenvolvimento dos anexos placentários. Portanto, o crescimento apenas das membranas não é suportada por longos períodos de tempo, levando a regressão e perda da

gestação. Pelas avaliações ultrassonográficas, o embrião não foi detectado em nenhuma dessas gestações. No entanto, não podemos afirmar que nenhum tecido embrionário estava presente nestas gestações. Este fato poderia justificar a grande variabilidade de sobrevivência observada nessas gestações, ou seja, aquelas que se mantiveram por mais tempo poderiam ter apresentado um nível de desenvolvimento tecidual do alantocórcion mais adequado, o que permitiu sua sobrevivência por um período de tempo maior.

Sobre esse assunto, trabalhos na literatura (Greenstein et al. 1958; King et al. 1980; 1981; 1982; Assis-Neto et al. 2009) descreveram a embriologia do desenvolvimento do concepto bovino e mostraram que no período de 25 a 30 dias do desenvolvimento das gestações normalmente-produzidas, ocorre expansão do saco alantoideano, e posterior união dele com o córcion, formando a placenta alantocoriônica. Apesar de haver perdas nas gestações anembrionadas também nesse período, algumas gestações conseguiram formar a placenta alantocoriônica. Nos dias 30 a 50 das gestações normalmente-produzidas ocorre justaposição mais firme entre o córcion e o alantoide e aumento da vascularização dessas membranas, ao mesmo tempo em que o âmnio delimita o embrião, formando a membrana amniótica. Os dias 50 a 60 são marcados como o início da fase fetal e os vasos alantoideanos se encontram perto do feto e são direcionados para as extremidades do saco gestacional e por toda a região acima do âmnio. Nessa fase as membranas são ligadas pelo cordão umbilical fetal. Nos dias 60 a 70 a membrana alantocoriônica mantém íntimo contato com o feto, e os vasos do cordão umbilical ramificam-se da região ventral do feto para toda a superfície das membranas (Greenstein et al. 1958; King et al. 1980; 1981; 1982; Assis-Neto et al. 2009). A partir do dia 50 em diante nas gestações anembrionadas, a probabilidade das gestações se manterem seria cada vez mais difícil, devido à necessidade da presença do feto, como ocorreu em muitas gestações que se perderam nesta fase. Apesar disso, algumas receptoras que mantiveram membranas preenchidas por líquido no útero e o corpo lúteo ativo até 108 dias, nos induziu a acreditar que, provavelmente, conseguiram estender o máximo a formação placentária sem presença do feto e manter as membranas vascularizadas, estagnando o crescimento placentário até o momento da luteólise.

8. CONCLUSÃO

8.1. ESTUDO 1

Em conclusão, o presente estudo detalhou por períodos críticos do desenvolvimento gestacional a ocorrência de perdas em gestações de clones bovinos produzidos por SCNT. Foi mostrado que o período crítico e determinante para o estabelecimento e desenvolvimento da prenhez, após a detecção ultrassonográfica do conceito, compreende os períodos de desenvolvimento do alantocórion e de placentação inicial. Confirmando, assim, a primeira hipótese do experimento: maior incidência de perdas gestacionais em prenhez de clones bovinos por SCNT é observada da detecção do conceito até o dia 60 da gestação, coincidindo com o período de placentação.

Os dados apresentados mostram atraso no desenvolvimento do conceito observado por ultrassonografia transretal em prenhez derivadas de clonagem por SCNT quando comparado com prenhez naturalmente concebidas. Confirmando a segunda hipótese desse experimento: perdas gestacionais podem ser preditas com base no exame das alterações de desenvolvimento (morfovasculares) do conceito visualizadas por meio de exame por ultrassonografia nos modos B e Doppler.

8.2. ESTUDO 2

Pela primeira vez na literatura é relatada a ocorrência em receptoras de embriões de clones bovinos produzidos por SCNT de dois fenótipos gestacionais anômalos, as gestações anembrionadas e receptoras apresentando corpo lúteo persistente. Além disso, esta é a primeira descrição na literatura de gestações anembrionadas em animais domésticos. Esses achados culminam com novos questionamentos sobre a importância do conceito (embrião/feto e seus anexos) na modulação do ambiente uterino durante a fase inicial da gestação. O estabelecimento e desenvolvimento adequado da gestação após o período de reconhecimento materno e durante o processo de vascularização placentária é crucial para a manutenção da gestação, sendo o momento crítico para a ocorrência das perdas gestacionais nas gestações incompetentes. O presente estudo abre portas para novas investigações utilizando o modelo experimental de gestações bovinas de embriões clonados por SCNT para se compreender os mecanismos de modulação e regulação do desenvolvimento morfovascular do complexo útero-placentário-fetal durante a gestação inicial.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS RM, SHARP DC. Heat flow technique for estimating uterine blood flow. *Biol Reprod.* 1977.
- AMOROSO EC. In *Marshall's Physiology of Reproduction*. Longman, Green and Co., London, 1952.
- ANDERSON AB, FLINT AP, TURNBULL AC. Mechanism of action of glucocorticoids in induction of ovine parturition: effect on placental steroid metabolism. *J Endocrinol.* 1975.
- ASSIS NETO AC, PEREIRA FTV, SANTOS TC, AMBROSIO CE, LEISER R, MIGLINO MA. Morpho-physical Recording of Bovine Conceptus (*Bos indicus*) and Placenta from Days 20 to 70 of Pregnancy. *Reprod Dom Anim.* 2010.
- ASSIS NETO AC, SANTOS ECC, PEREIRA FTV, MIGLINO MA. Initial Development of Bovine Placentation (*Bos indicus*) from the Point of View of the Allantois and Amnion. *Anat. Histol. Embryol.* 2009.
- ASSIS NETO AC, OLIVEIRA FD, CONSTANTINO MVP, MIGLINO MA. Morphology and Involution of the Yolk Sac during Early Gestation Bovine (*Bos indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae.* 2012.
- BAZER FW, SONG G, THATCHER WW. Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. *J. Anim. Sci.* 2012.
- BAZER FW, SPENCER TE, OTT TI. Immunology interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *American journal of Reproductive.* 1997.
- BERTOLINI M, MOYER AL, MASON JB, BATCHELDER CA, HOFFERT KA, BERTOLINI LR, CARNEIRO GF, CARGILL SL, FAMULA TR, CALVERT CC, SAINZ RD, ANDERSON GB. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine fetuses and association with accelerated conceptus growth. *Reproduction.* 2004.
- BOLLWEIN H, MAYER HH, MAIERL J, WEBER F, BAUMGARTNER U, STOLLA R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle.

Theriogenology. 2000.

BOLLWEIN H, WEBER F, KOLBERG B, STOLLA R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002a.

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. *Nature Biotechnology*. 2003.

BUCZINSKI S. Ultrasonographic Assessment of Late Term Pregnancy in Cattle .*Vet Clin Food Anim*. 2009.

CAMPBELL KHS, MCWHIR J, RITCHIE WA, WILMUT I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 1996.

CATON D, ABRAMS RM, CLAPP JF, BARRON DH. The effect of exogenous progesterone on the rate of blood flow of the uterus of ovariectomized sheep. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1974.

CATON D, KALRA PS. Endogenous hormones and regulation of uterine blood flow during pregnancy. *Am J Physiol*. 1986.

CHAVATTE-PALMER P, CAMOUS S, JAMMES H, LE CLEAC'H N, GUILLOMOT M, LEE RSF. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*. 2012.

CHEBEL RC, SANTOS JE, REYNOLDS JP, CERRI RL, JUCHEM SO, OVERTON M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2004.

CHEBEL RC, SANTOS JEP, CERRI RLA, GALVAO KN, JUCHEM SO, THATCHER WW. Effect of resynchronization with gnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2003.

CONSTANT F, GUILLOMOT M, HEYMAN Y, VIGNON X, LAIGRE P, SERVELY JL, RENARD JP, CHAVATTE-PALMER P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biology of Reproduction*. 2006.

CURRAN S, PIERSON RA, GINTHER OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *J Med Vet Assoc.* 1986.

CURRAN S, PIERSON RA & GINTHER OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1986a.

CURRAN S, PIERSON RA & GINTHER OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1986b.

DAVIS SR, COLLIER RJ. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. *J Dairy Sci.* 1985.

DE SOUSA PA, KING T, HARKNESS L, YOUNG LE, WALKER SK & WILMUT I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biology of Reproduction.* 2001.

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. *PNAS.* 2001.

DORNIK P, BAZER FW, SPENCER TE. Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *J Anim Sci.* 2013.

DROST M, AMBROSE JD, THATCHER MJ, CANTRELL CK, WOLFSDORF KE, HASLER JF, THATCHER WW. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology.* 1999.

EDWARDS JL, SCHRICK FN, MCCRACKEN MD, VAN AMSTEL SR, HOPKINS FM, WELBORN MG, DAVIES CJ. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Amer J Reprod Immunol.* 2003.

EL-REFAEY H, HINSHAW K, HENSHAW R, SMITH N, TEMPLETON A. Medical management of missed abortion and anembryonic pregnancy. *BMJ.* 1992.

EVERTS RE, CHAVATTE-PALMER P, RAZZAK A, HUE I, GREEN CA, OLIVEIRA R, VIGNON X, RODRIGUEZ-ZAS SL, TIAN XC, YANG X, RENARD JP, LEWIN HA.

Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiological Genomics*. 2008.

FARIN PW, PIEDRAHITA JA, FARIN CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2006.

FERRELL CL, FORD SP. Blood flow, steroid secretion, and nutrient uptake of the gravid bovine uterus. *J Anim Sci*. 1980.

FLETCHER CJ, ROBERTS CT, HARTWICH KM, WALKER SK, MCMILLEN, IC. Somatic cell nuclear transfer in the sheep induces placental defects that likely precede fetal demise. *Reproduction*. 2007.

FORD SP, CHENAULT JR, ECHTERNKAMP SE. Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. *J Reprod Fertil*. 1979.

FORD SP, CHENAULT JR. Blood Flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod*. 1981.

FORD SP, CHRISTENSON RK, FORD JJ. Uterine blood flow and uterine arterial venous and luminal concentrations of estrogens on days 11, 13 and 15 after estrus in pregnant and nonpregnant sows. *J Reprod Fertil*. 1982a.

FORD SP, CHRISTENSON RK. Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy: local effect of the conceptus on the uterine blood supply. *Biol Reprod*. 1979.

FORD SP, REYNOLDS LP, MAGNESS RR. Blood flow to the uterine and ovarian vascular beds of gilts during the estrous cycle or early pregnancy. *Biol Reprod*. 1982b.

FORD SP. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of the ewe, sow and cow. *J Anim Sci*. 1982.

GALLI C, LAGUTINA I, PEROTA A, COLLEONI S, DUCHI R, LUCCHINI F, LAZZARI G. Somatic Cell Nuclear Transfer and Transgenesis in Large Animals: Current and Future Insights. *Reprod Dom Anim*. 2012.

GINTHER OJ AND MATTHEW D. Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles,

Techniques, and Potential. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2004.

GINTHER OJ, SILVA LA, ARAUJO RR, BEG MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 2007.

GINTHER OJ, UTT MD. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *J Equine Vet Sci*. 2004.

GINTHER OJ. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 3, Cattle*. Equiservices Publishing. 1998.

GINTHER OJ. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 4, Color-Doppler Ultrasonography*. Equiservices Publishing. 2007.

GINTHER OJ. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses. Book 2*. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing. 1995.

GREISS FC, ANDERSON SG. Uterine blood flow during early ovine pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1970.

GREISS FC, ANDERSON SG. Uterine vascular changes during the ovarian cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1969.

HASHIZUME K, ISHIWATA H, KIZAKI K, YAMADA O, TAKAHASHI T, IMAI K, PATEL OV, AKAGI S, SHIMIZU M, TAKAHASHI S. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning and Stem Cells.* 2002.

HIENDLEDER S, MUND C, REICHENBACH HD, WENIGERKIND H, BREM G, ZAKHARTCHENKO V, LYKO F, WOLF E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biology of reproduction.* 2004.

HILL JR, BURGHARDT RC, JONES K, LONG CR, LOONEY CR, SHINT, SPENCER TE, THOMPSON JA, WINGER QA, WESTHUSIN ME. Evidence for Placental Abnormality as the Major Cause of Mortality in First-Trimester Somatic Cell Cloned Bovine Fetuses. *Biology of reproduction.* 2000.

HILL JR, ROUSSEL AJ, CIBELLI JB, EDWARDS JF, HOOPER NL, MILLER MW, THOMPSON JA, LOONEY CR, WESTHUSIN ME, ROBL JM, STICE SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*. 1999.

HONNENS A, VOSS C, HERZOG K, NIEMANN H, RATH D, BOLLWEIN H. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. *Theriogenology*. 2008c.

HONNENS A, NIEMANN H, PAUL V, MEYER HH, BOLLWEIN H. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle. Uterine blood flow in superovulated cattle. *Theriogenology*. 2008b

HOSHINO Y, HAYASHI N, TANIGUCHI S, KOBAYASHI N, SAKAI K, OTANI T, IRITANI A, SAEKI K. Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80 degrees c freezer for a decade. *PLoS ONE*. 2009.

HUAN Y, WANG H, WU Z, ZHANG J, LIU Z, HE H. The expression patterns of DNA methylation reprogramming related genes are associated with the developmental competence of cloned embryos after zygotic genome activation in pigs. *Gene Expression Patterns*. 2015

HUCKABEE WE, CRENSHAW C, CURET LB, BARRON DH. Blood flow and oxygen consumption of the uterus of the nonpregnant ewe. *Q J Exp Physiol*. 1968.

HUCKABEE WE, CRENSHAW C, CURET LB, BARRON DH. The effect of exogenous oestrogen on the blood flow and oxygen consumption of the nonpregnant ewe. *Q J Exp Physiol*. 1970.

HUCKABEE WE, METCALF J, PRYSTOWSKY H, BARRON DH. Blood flow and oxygen consumption of the pregnant uterus. *Amer J Physiol*. 1961.

IETS. 2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*. 2014.

JOHNSON MR, RIDDLE AF, SHARMA V, COLLINS WP, NICOLAIDES KH, GRUDZINSKAS JG. Placental and ovarian hormones in anembryonic pregnancy. *Hum Reprod*. 1993.

JONES AL, LAMB GC. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 2008.

KANG YK, KOO DB, PARK JS, CHOI YH, CHUNG AS, LEE KK, HAN YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics*. 2001.

KASTELIC JP, CURRAN S, GINTHER OJ. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*. 1989.

KASTELIC JP, CURRAN S, PIERSON RA, GINTHER OJ. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*. 1988.

KING GJ, ATKINSON BA, ROBERTSON HA. Development of the bovine placentome from Days 20 to 29 of gestation. *J Reprod Fertil*. 1980.

KING GJ, ATKINSON BA, ROBERTSON HA. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. *J Reprod Fertil*. 1981.

KNICKERBOCKER JJ, THATCHER WW, FOSTER DB, WOLFENSON D, BARTOL FF, CATON D. Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 beta in cyclic cattle. *Prostaglandins*. 1986.

KRUEGER L, KOERTE J, TSOUSIS G, HERZOG K, FLACHOWSKY G, BOLLWEIN H. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2008.

KUBOTA C, YAMAKUCHI H, TODOROKI J, MIZOSHITA K, TABARA N, BARBER M, YANG X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000.

LEISER R, KAUFMANN P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*. 1994.

LOI P, BEAUJEAN N, KHOCHBIN S, FULKA JR J, PTAK G. Asymmetric nuclear reprogramming in somatic cell nuclear transfer? *BioEssays*. 2007.

MELLO MRB, CAETANO HVA, MARQUES MG, PADILHA MS, GARCIA JF, MILAZZOTTO MP, ASSUMPÇÃO MEOA, LIMA AS, NICÁCIO AC, MENDES CM,

OLIVEIRA VP, VISINTIN JA. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. Brazilian J Med Biol Res. 2003.

MENG L, JIA R, SUN Y, WANG Z, WAN Y, ZHANG Y, ZHONG B, WANG F. Growth regulation, imprinting, and epigenetic transcription-related gene expression differs in lung of deceased transgenic cloned and normal goats. Theriogenology. 2014.

MERIGHE GKF. Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil. 2007.

MIGLINO MA, PEREIRA FTV, VISINTIN JA, GARCIA JM, MEIRELLES FV, RUMPF R, AMBRÓSIO CE, PAPA PC, SANTOS TC, CARVALHO AF, LEISER R, CARTER AM. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. Theriogenology. 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA; Assessoria De Gestão E Estratégica - AGE. Projeção do Agronegócio Mundial e Brasil. 2007. Acesso em: 11 fev. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA; Assessoria de Gestão e Estratégica - AGE. Projeção do agronegócio mundial e brasil. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes_do_agronegocio_2025_web.pdf> acesso em: 11 fev. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA; Bovinos e Bubalinos. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

MOREIRA F, ORLANDI C, RISCO CA, MATTOS R, LOPES F, THATCHER WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time artificial insemination protocol in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2001.

MOUSSA M, SHU J, ZHANG XH, ZENG F. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". Abstract send to: Anim Reprod Sci. 2015 Apr; 155:11-27. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.01.011. Epub; Jan 31. 2015.

NIEMANN H, TIAN XC, KING WA, LEE RSF. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction*. 2008.

OBACK B, WELLS DN. Cloning cattle: the methods in the madness. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007.

OCDE-FAO. *Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024*. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>> acesso em: 11 fev. 2016.

PANARACE M, GARNIL C, MARFIL M, JAUREGUI G, LAGIOIA J, LUTHER E, MEDINA M. Transrectal Doppler sonography for evaluation of uterine blood flow throughout pregnancy pregnancy in 13 cows. *Theriogenology*. 2006.

PAULESU L, PFARRER C, ROMAGNOLI R, IETTA F, CALLESEN H, HAMBRUCH N, DANTZER V. Variation in Macrophage Migration Inhibitory Factor .[MIF] immunoreactivity during bovine gestation. *Placenta*. 2012.

PETROVIĆ O, GUDELJ L, RUBESA G, HALLER H, BEER AE, RUKAVINA D. Decidual-trophoblast interactions: decidual lymphoid cell function in normal, anembryonic, missedabortion and ectopic human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 1994.

PIERSON RA, GINTHER OJ. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology*. 1984.

REYNOLDS LP, BOROWICZ PP, CATON JS, VONNAHME KA, LUTHER JS, BUCHANAN DS, HAFEZ SA, GRAZUL-BILSKA AT, REDMER DA. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol*. 2010.

REYNOLDS LP, CATON JS, REDMER DA, GRAZUL-BILSKA AT, VONNAHME KA, BOROWICZ PP, LUTHER JC, WALLACE JM, WU G, SPENCER TE. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol*. 2006.

REYNOLDS LP, FERREL CL, ROBERTSON DA, FORD SP. Metabolism of the gravid uterus, foetus and uteroplacenta at several stages of gestation in cows. *J Agric Sci*. 1986.

RICHT JA, KASINATHAN P, HAMIR AN, CASTILLA J, SATHIYASEELAN T, VARGAS F, SATHIYASEELAN J, WU H, MATSUSHITA H, KOSTER J, KATO S, ISHIDA I, SOTO C, ROBL JM, KUROIWA Y. Production of cattle I. 2007.

ROMAN-PONCE H, CATON D, THATCHER WW, LEHRER R. Uterine blood flow in relation to endogenous hormones during estrous cycle and early pregnancy. *Am J Physiol.* 1983.

ROMERO JJ, ANTONIAZZI AQ, NETT TM, ASHLEY RL, WEBB BT, SMIRNOVA NP, BOTT RC, BRUEMMER JE, BAZER FW, ANTHONY RV, HANSEN TR. Temporal Release, Paracrine and Endocrine Actions of Ovine Conceptus-Derived Interferon-Tau During Early Pregnancy. *Biology of Reproduction.* 2015.

ROSS PJ, CIBELLI JB. Bovine somatic cell nuclear transfer. *Methods in Molecular Biology.* 2010.

SANGALLI JR, DE BEM THC, PERECIN F, CHIARATTI MR, OLIVEIRA LJ, ARAÚJO RR, PIMENTEL JRV, SMITH LC, MEIRELLES FV. Treatment of nuclear-donor cell or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell Reprogram.* 2012.

SANTOS JE, THATCHER WW, CHEBEL RC, CERRI RL, GALVÃO KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci.* 2004.

SARTORI R, GUMEN A, GUENTHER JN, SOUZA AH, WILTBANK MC. Comparison of artificial insemination (AI) versus embryo transfer (ET) in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2003.

SCHLAFER DH, FISHER PJ, DAVIES CJ. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science.* 2000.

SEISENBERGER S, PEAT JR, HORE TA, SANTOS F, DEAN W, REIK W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Phil Trans R Soc B.* 2012.

SILVA, LA, GINTHER OJ. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*. 2010.

SMITH LC, SUZUKI JR J, GOFF AK, FILION F, THERRIEN J, MURPHY BD, KOHANGHADR HR, LEFEBVRE R, BRISVILLE AC, BUCZINSKI S, FECTEAU G, PERECIN F AND MEIRELLES FV. Developmental and Epigenetic Anomalies in Cloned Cattle. *Reprod Dom Anim*. 2012.

SPELL AR, BEAL WE, CORAH LR, LAMB GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 2001.

SPENCER TE, HANSEN TR. Implantation and Establishment of Pregnancy in Ruminants. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2015.

STICE SL, ROBL JM, PONCE DE LEON FA, JERRY J, GOLUEKE PJ, CIBELLI JB, KANE JJ. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*. 1998.

STICE SL, STRELCHENKO NS, KEEFER CL, MATTHEWS L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod*. 1996.

TELGEMANN R, BATHGATE RA, JAEGER S, TILLMANN G, IVELL R. Transcriptional regulation of the bovine oxytocin receptor gene. *Biol Reprod*. 2003.

WALL RJ, KERR DE, BONDIOLI KR. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J Dairy Sci*. 1997.

WELLS DN, FORSYTH JT, MCMILLAN V, OBACK B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning and Stem Cells*. 2004.

WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR, VIVANCO WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*. 1998.

WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*. 1999.

WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997.

WOLF REIK. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*. 2001.

WOLFENSON D, THATCHER WW, DROST M, CATON D, FOSTER DB, LEBLANC MM. Characteristics of prostaglandin F measurements in the ovarian circulation during the oestrous cycle and early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil*. 1985.

WOODING FB. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*. 1992.

WOODING FBP, MORGAN G, ADAM CL. Structure and Function in the Ruminant Synepitheliochorial Placenta: Central Role of the Trophoblast Binucleate Cell in Deer. *Microscopy Research and Technique*. 1997.

YONAI M, KANEYAMA K, MIYASHITA N, KOBAYASHI S, GOTO Y, BETTPU T, NAGAI T. Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *Journal of Dairy Science*. 2005.