



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

FELIPPE MANOEL COSTA CAIXETA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO DE 2016



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

ALUNO: FELIPPE MANOEL COSTA CAIXETA

ORIENTADORA: IVO PIVATO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 149/2016

BRASÍLIA

FEVEREIRO/2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CAIXETA, F. M. C. **Bloqueio meiótico como alternativa para aumentar a produção de embriões clone.** Brasília: Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 73 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Caixeta , Felipe Manoel Costa
CB655b BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR
/ Felipe Manoel Costa Caixeta ; orientador Ivo
Pivato. -- Brasília, 2016.
73 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência
Animal) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Pré-maturação . 2. cilostamida. 3.
transferência nuclear com células somáticas. 4.
retenção meiótica. I. Pivato, Ivo, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BLOQUEIO MEIOTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE**

FELIPPE MANOEL COSTA CAIXETA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS Á OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

IVO PIVATO, Dr.(UNB) (ORIENTADOR)

GIANE REGINA PALUDO, Dra. (UNB) (EXAMINADORA INTERNA)

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA-CENARGEN)
(EXAMINADORA EXTERNA)**

BRASÍLIA/DF, 5 DE FEVEREIRO DE 2016

Dedico esta conquista a Deus, aos meus pais, Moacir dos Reis Caixeta e Marcia Alvina Costa Caixeta e meus irmãos, Ana Caroline e Lucas, pelo apoio e compreensão em todos os momentos, pelas palavras de incentivo e carinho durante todo o tempo e a minha namorada Fernanda, pela paciência, apoio e amor para vencer mais essa fase.

A vocês Dedico!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim e não mediram esforços para que eu alcançasse o que queria nos estudos. Vocês são meus exemplos, a razão do meu esforço, a quem devo essa conquista. Amo Vocês!

A minha namorada Fernanda Coelho, pela paciência, carinho, amor, compreensão, apoio e por sempre ter estado do meu lado.

Aos familiares que me apoiaram, torcerem e me incentivarem durante esta jornada. Muito obrigado!

Ao meu Orientador, Dr. Ivo Pivato, por toda atenção, companheirismo, prestatividade e profissionalismo. MUITÍSSIMO Obrigado!

A pesquisadora, Dra. Margot, pela atenção a mim cedida, pelos conhecimentos compartilhados, conselhos e incentivos. Você é um exemplo de pessoa tanto profissional quanto pessoal. Muito obrigado!

Ao Técnico Regivaldo, Pelos ensinamentos, paciência, atenção e confiança. Muito obrigado!

Aos que contribuíram diretamente para a execução deste trabalho, José Felipe, Dra. Margot, Ligiane Leme, Ana Luiza, Severino Netto, Regivaldo, Venâncio, Raminho, Sr. Arlindo, Sr. Zequinha, Sidney, estagiários e aos funcionários do frigorífico Qualimáxima (Luziânia-GO) e Nipobras (Formosa- GO e Planaltina –DF). Muito obrigado!

Aos meus colegas e amigos, Zé, Eleonora, Chico, Carolle, Oscar, Nathália, Renato, Anelise, João, Malane, Nayara, Luzia, Paraíba (Netto), Mateus, Luiz, Andrey, Ligiane, Ana Luiza, Thiago Braga, Thiago Silva, Andrielle, Zezinho e todos os estagiários, pelas amizades, brincadeiras e ensinamentos. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de pós-graduação em ciências animais da UnB, pelos conhecimentos transmitidos. Muito obrigado!

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CERNARGEN pela confiança e pelos conhecimentos passados. Muito obrigado!

A todos os funcionários do LRA e Fazenda Sucupira, pelas ajudas quando mais precisei. Muito obrigado!

A todos os outros amigos do curso de Mestrado em Ciências animais e de fora dele, que de algum modo contribuíram para a minha formação pessoal. Muito obrigado!

Aos frigoríficos Qualimáxima e Nipobras por ceder material biológico para a realização desse experimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais, por tornarem o trabalho uma fonte de estímulo, alegria e força. Muito obrigado!

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xv
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR	3
2.1.1 CITOPLASMA DO OVÓCITO: FONTE E QUALIDADE DO OVÓCITO	4
2.1.2 CÉLULA DOADORA	5
2.1.3 ENUCLEAÇÃO, RECONSTRUÇÃO E ATIVAÇÃO DOS OVÓCITOS 2.1.4 CULTIVO EMBRIONÁRIO	7
2.1.5 APLICAÇÕES DA CLONAGEM	9
2.2 MATURAÇÃO OVOCITÁRIA	11
2.3 CONTROLE DA MATURAÇÃO	12
2.4 RETENÇÃO DA MEIOSE	13
CAPÍTULO 2. BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE	16
RESUMO	17
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	21
1 MATERIAL E MÉTODOS	23
1.1 REAGENTES E PRODUTOS QUÍMICOS	23
1.2 RECUPERAÇÃO E SELEÇÃO DOS OVÓCITOS	23
1.3 PRÉ-MATURAÇÃO (PM) E MATURAÇÃO (MIV) DOS COMPLEXOS CUMULUS OVÓCITO (CCOs)	24
1.4 SELEÇÃO E PREPARO DOS OVÓCITOS PARA MICROMANIPULAÇÃO	24
1.5 CULTIVO E PREPARO DAS CÉLULAS SOMÁTICAS	25
1.6 TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS) 1.7 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	26
1.7 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	27
1.8 CULTIVO <i>IN VITRO DE</i> EMBRIÕES	27
1.9 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR	28
1.10 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS	28
2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
2.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA CILOSTAMIDA DURANTE A PRÉ- MATURAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)	28
2.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO DO TIPO C (NPPC) DURANTE A PRÉ-MATURAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)	29
3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1	31
4.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2	33
4.3 DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Felippe Manoel Costa Caixeta¹, Ivo Pivato²

¹Médico Veterinário, Brasília-DF, Brasil, ²Professor Dr., Brasília-DF, Brasil

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito do bloqueio meiótico utilizando inibidores da fosfodiesterase do tipo 3A (PDE 3A) na produção de embriões clones. Para tanto, foram realizados dois experimentos utilizando dois inibidores da retomada da meiose: cilostamida, um inibidor específico da Fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3A), e o Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC), um sinalizador para liberação de guanilato ciclase (cGMP) que bloqueia atividade da PDE3A. Ovócitos provenientes de ovários de abatedouro foram divididos em dois grupos para cada experimento: Controle (maturação por 20 horas) e Pré-Maturados (PM) por 6 horas com 5 μ M de cilostamida ou 100 nM de NPPC e, posteriormente maturados por 20 horas. Os ovócitos foram avaliados quanto à cinética de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário na produção *in vitro* de embriões (PIVE) e na clonagem por TNCS e, número total de células. Para a avaliação da Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS) em cada tratamento, foi adicionado um grupo controle que foi ativado partenogeneticamente (PA). Os resultados foram avaliados pelo teste de Chi-quadrado e Kruskal-Wallis com $P < 0.05$ considerado como significativo. No primeiro experimento, em que a PM foi realizado com 5 μ M de cilostamida, aproximadamente 87,8% dos ovócitos submetidos à Pré- maturação se mantiveram em estágio de Vesícula Germinativa (VG) após 6 horas de PM, confirmando o bloqueio meiótico. Quanto ao desenvolvimento embrionário na PIVE, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle e PM quanto à taxa de clivagem

em D2 (78,2% e 76,9%) e Blastocisto em D7 (35,5% e 29,3%). No desenvolvimento embrionário após a TNCS, a PM não afetou a taxa de clivagem em D2 dos grupos controle e PM respectivamente (66% e 51,9%), mas causou uma redução ($P < 0,05$) na taxa de blastocisto em D7 (7,4% e 30,2%, respectivamente). No segundo experimento, foi utilizado NPPC para a PM dos ovócitos, sendo que após 6 horas de PM 84,9% estavam em estágio de VG. Quanto ao desenvolvimento embrionário na PIVE, os grupos controle e PM apresentaram taxa de clivagem em D2 (76,4% e 77,8%) e de blastocisto em D7 (48,3% e 45,6%) semelhantes ($P > 0,05$). Na clonagem por TNCS, não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de clivagem (69,2% e 68,4%) e de blastocisto (24,4% e 21,5%) entre o PM e controle. Os embriões clones e PA dos grupos PM e controle não diferiram quando ao número total de células ($P > 0,05$). Conclui-se que a PM por 6 horas com 100 nM de NPPC é viável para a produção de embriões clones sem efeito deletério na qualidade e nas taxas de produção.

Palavras chave: Pré-maturação, cilostamida, transferência nuclear com células somáticas, retenção meiótica.

ABSTRACT

MEIOTIC ARREST AS AN ALTERNATIVE TO INCREASE PRODUCTION OF CLONED EMBRYOS BY NUCLEAR TRANSFER

Felippe Manoel Costa Caixeta¹, Ivo Pivato²

¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²PhD, Brasília-DF, Brazil

This study aimed to evaluate the effect of meiotic arrest using phosphodiesterase type 3A (PDE 3A) inhibitors in the production of clones embryos. Two experiments were performed using two inhibitors of meiotic resumption: cilostamide, a specific inhibitor of phosphodiesterase type 3 (PDE3A), and natriuretic peptide type C (NPPC), a peptide that induces the production of guanylate cyclase (cGMP) that blocks the activity of PDE3A. Oocytes obtained from slaughterhouse ovaries were divided into two groups for each experiment: control (maturation for 20 hours) and Pre-Maturarion (PM) for 6 hours with 5 μ M of cilostamide or 100 nM of NPPC and then maturation for 20 hours. The oocytes were evaluated for nuclear maturation, embryonic development after *in vitro* embryo production (IVP), and after SCNT, and total cells number. For SCNT evaluation in each treatment a control group that was activated parthenogenetically (PA) was added. The results were evaluated by Chi-square and Kruskal-Wallis test with $P < 0.05$ considered significant. In the first experiment, where the PM was carried out with 5 μ M of cilostamide, approximately 87.8% of the oocytes that have undergone PM remained at germinal vesicle stage (GV) after 6 hours of PM, confirming the meiotic block. Embryo development in IVP was similar ($P > 0.05$) between control and PM, either for cleavage rate on D2 (78.2% and 76.9%) or blastocyst rate on D7 (35, 5% to 29.3%). After SCTN, cleavage rate on D2 was also similar ($P > 0.05$) between control and PM (66% and 51.9%) however, blastocyst rate on D7, was much lower ($P < 0.05$) in PM than on control group (7.4% and 30.2%). In the second

experiment, NPPC was used for 6 hours of PM. After PM approximately 84.9% of the oocytes remained at VG stage. Results of IVP showed no difference between control and PM on cleavage (76.4% and 77.8%) and blastocyst rates (48.3% and 45.6%). Similarly, no differences between PM and control groups were observed for cleavage (69.2% and 68.4%) and blastocyst (24.4% and 21.5%) rates. SCNT and PA embryos from control or PM oocytes showed no differences in the total cell number. It can be concluded that PM for 6 hours with 100nM NPPC is feasible for embryos cloned production without deleterious effect on the outcome and embryo.

Keywords: pre-maturation, cilostamide, Somatic Cell Nuclear Transfer, meiotic arrest.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Figura	Página
Capítulo 2		
Figura 1. Representação Esquemática da Placa de Micromanipulação. LAV = Meio de Lavagem ; LAV-BSA= Meio de lavagem suplementado com BSA, solução TCM Hank's sem cloridrato de Cálcio e sulfato de Magnésio com 0,0200g de albumina sérica bovina; PVP = Meio de Lubrificação das Pipetas de micromanipulação.		23

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Estágios da Maturação Nuclear de ovócitos bovinos Pré-Maturados (PM) ou não (MIV) com 5 μ M de Cilostamida por 0, 6, 14 e 20 horas.	29
Tabela 2. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 5 μ M Cilostamida ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto após a fecundação e o cultivo in vitro.	30
Tabela 3. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 5 μ M cilostamida ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto submetidos à transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ou ativação partenogênica (PA)	31
Tabela 4. Estágios da Maturação Nuclear de ovócitos bovinos Pré-Maturados (PM) ou não (MIV) com 100nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) por 0, 6, 14 e 20 horas	32
Tabela 5. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 100nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto após a fecundação e o cultivo in vitro.	32
Tabela 6. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 100 nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto submetidos à transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ou ativação partenogênica (PA).	33
Tabela 7. Número de células de embriões clones por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ou ativação partenogênica (PA) produzidos à partir de ovócitos Pré-maturados (PM) com 100nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) por 6 horas ou não (MIV) em D7	34

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AI = Anáfase I
 AC = Adenilato ciclase
 cAMP = Adenosina Monofosfato cíclico
 AREG = Ampirreguliana
 ATP = Trifosfato de adenosina
 BTC = Betacelulina
 Bx = Blastocisto expandido
 BSA-FAF = Albumina sérica bovina livre de ácido graxo
 CC = Células do *cumulus*
 Cdk = Quinase dependente de ciclina
 CG= Complexo de Golgi
 CIV = Cultivo *in vitro*
 CO₂ = Dióxido de carbono
 CCOs = Complexo-*cumulus*-ovócito
 CP = Corpúsculo polar
 CHX= Ciclohexamida
 DMAP= Dimetilaminopurina
 DMSO = Dimetil sulfóxido
 DNA= Ácido desoxirribonucleico
 EGFR = Receptor para EGF
 EREG = Epirregulina
 FIV = Fecundação *in vitro*
 FSB = Soro fetal bovino
 FSH = Hormônio folículo estimulante
 FSHr = Hormônio folículo estimulante recombinante
 cGMP = Guanosina monofosfato cíclico
 GC= Grânulos Corticais
 GDF9= Fator de Crescimento diferenciação 9
 GVBD = Quebra da vesícula germinativa
 HDAC= Histona Deacetilase
 HMC= *Hand Made Cloning*
 IBMX = 1- isobutil, 3- metilxantina
 IGF = fator de crescimento semelhante á insulina
 JG = Junções Gap
 LAV= Meio de Lavagem
 LH = Hormônio luteinizante
 LRA- EMBRAPA CENARGEN = Laboratório de Reprodução Animal – EMBRAPA CENARGEN
 M I = Metáfase I
 MII = Metáfase II
 MAPK = Proteína ativada por mitógeno quinase
 MEK = Proteína quinase ativadora da MAPK
 MgSO₄= Sulfato de Magnésio
 MIV = Maturação *in vitro*
 MPF = Fator de promoção da maturação
 NaCl = Cloreto de sódio
 N₂ = Nitrogênio
 NO = Óxido nítrico

NPPC= Peptídeo Natriurético do tipo C
NPR= Receptor Peptídeo Natriurético
O₂ = Oxigênio
PA= Ativação Partenogenética
PBS = Solução salina em tampão fosfato
PDE = Fosfodiesterase
PHE = Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIVE = Produção *in vitro* de embriões
PM= Pré-Maturação
PVP= Polivinilpirrolidona
mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro
SAH= S-adenosil-L-homocisteína
SOF = Fluido sintético do oviduto com aminoácidos
SPOM = *Simulated physiological oocyte maturation*
T I = Telófase I
TALP = *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate*
TCM 199 = *Tissue culture medium 199*
TN= Transferência Nuclear
TNCS= Transferência Nuclear com Células Somáticas
TRA = Técnicas de reprodução assistida
UI = Unidade Internacional
VG = Vesícula germinativa
VGBD = Quebra da vesícula germinativa

1 INTRODUÇÃO

A clonagem por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) é a produção de indivíduos geneticamente idênticos e consiste, basicamente, na remoção do material genético do ovócito receptor e a reconstrução com a célula doadora de DNA (Campbell *et al.*, 1994). Essa técnica é importante para a conservação de recursos genéticos, biomedicina e ciência básica, podendo também beneficiar os sistemas de produção animal (Niemann e Lucas-Hahn, 2012). Entretanto, para que seja uma alternativa viável de ser utilizada é necessário melhorar a sua eficiência (Campbell *et al.*, 2007). Apesar da TNCS já ter sido realizada com sucesso em diferentes espécies animais com diferentes tipos celulares, a sua eficiência é muito baixa (Campbell *et al.*, 1994). Em bovinos, as taxas de blastocisto obtidas são semelhantes às da produção *in vitro* de embriões (PIVE), porém, um alto índice de perda embrionária ocorre no início da gestação, geralmente durante a fase de placentação sendo que apenas 11% dos embriões produzidos e transferidos chegam a termo (Keefer, 2015). Vários problemas relacionados à técnica precisam ser resolvidos, entre eles a qualidade dos ovócitos, a reprogramação epigenética e o sistema de cultivo embrionário.

Com relação aos ovócitos, por exemplo, cerca de 400 citoplasmas receptores são necessários no dia da manipulação, para se ter nascimento de um produto clonado. Entretanto, por se tratar de uma técnica trabalhosa e demorada, o tempo para micromanipular esse número de ovócitos ultrapassa o período em que eles permanecem viáveis após a retirada do folículo. Ou seja, um dos problemas é o número limitado de ovócitos que o técnico é capaz de micromanipular em um dia, sem que a qualidade do ovócito seja afetada. Portanto, para aumentar a produção de animais clones é necessário manipular o maior número possível de ovócitos competentes (De Bem *et al.*, 2011).

Uma alternativa para disponibilizar uma maior quantidade de ovócitos para micromanipulação seria através do bloqueio meiótico. Esse procedimento possibilita bloquear a retomada da meiose, que ocorre logo após a retirada do ambiente folicular, através da

utilização de inibidores evitando assim o envelhecimento do ovócito (Barretto *et al.*, 2011; Dieci, C. *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; Guimaraes *et al.*, 2015b; a). Desta forma, é possível realizar duas ou mais manipulações no mesmo dia, utilizando um grande número de ovócitos sem prejuízo para o ovócito.

A possibilidade de utilizar essa técnica seria de grande valia para a rotina da TNCS. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de viabilizar o uso da retenção na TNCS nas espécies domésticas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo utilizar o bloqueio meiótico para melhorar a qualidade e aumentar a quantidade de ovócitos disponíveis para micromanipulação e, conseqüentemente aumentar a produção de embriões clones.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do bloqueio meiótico utilizando inibidores da fosfodiesterase do tipo 3A (PDE 3A) na produção de embriões clones.

1.2 Objetivos específicos

- 1- Determinar a eficiência da cilostamida em reter a meiose de ovócitos bovinos por 6 horas para ser utilizada na pré-maturação (PM);
- 2- Avaliar o efeito da PM utilizando a cilostamida por 6 horas na produção de embriões PIVE e clones;
- 3- Determinar a eficiência do peptídeo natriurético do tipo C (NPPC) em reter a meiose de ovócitos bovinos por 6 horas para ser utilizada na PM;
- 4- Avaliar o efeito da PM utilizando o NPPC por 6 horas na produção de embriões PIVE e clones

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Clonagem Por Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS)

A clonagem por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) consiste da remoção do material genético de um ovócito receptor, que receberá em seu lugar o núcleo de uma célula doadora do animal que se deseja clonar (Campbell *et al.*, 1994; Niemann e Lucas-Hahn, 2012; Ogura *et al.*, 2013).

Desde o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut *et al.*, 1997), que foi o primeiro mamífero clonado utilizando células somáticas, esta técnica vem sendo intensivamente estudada. Apesar do nascimento de produtos de várias espécies de mamíferos tais como bovinos (Green *et al.*, 2007), caprinos (Hosseini *et al.*, 2015), gato selvagem (Gómez *et al.*, 2004), ovinos (Wilmut *et al.*, 2007), gatos domésticos (Shin *et al.*, 2002) e búfalos (Shi *et al.*, 2007) terem sido relatados, a clonagem por TNCS continua sendo um processo ineficiente (Niemann e Lucas-Hahn, 2012). Isso porque na clonagem utilizando células somáticas, uma drástica remodelação e reprogramação do DNA é necessária para que essa célula diferenciada possa retomar o estágio embrionário após a transferência para um citoplasma receptor. Em geral a eficiência da TNCS não mudou muito nos últimos anos, sendo que em bovinos cerca de 11 % dos embriões transferidos resultam em nascimento (Keefer, 2015).

A técnica de transferência nuclear com células somáticas (TNCS) consiste basicamente de três etapas principais: a enucleação do ovócito receptor, a reconstrução com a célula doadora de núcleo e a ativação desse ovócito para formar um provável zigoto. Após serem cultivados *in vitro*, os embriões provenientes desse processo serão transferidos para o útero de fêmeas receptoras, que levarão a gestação a termo (Vajta e Gjerris, 2006; Niemann e Lucas-Hahn, 2012).

Vários fatores afetam a eficiência da reprogramação nuclear após a TNCS, dentre eles, a qualidade do citoplasma receptor (ovócito), a fonte e o status das células doadoras, ou

seja, a capacidade da célula se reprogramar epigeneticamente, o momento e método da ativação e da fusão e as condições do cultivo embrionário (Campbell *et al.*, 1996).

2.1.1 Citoplasma do ovócito: fonte e qualidade do ovócito

O citoplasma receptor tem um profundo impacto no sucesso da TNCS, pois tem um papel fundamental no processo de reprogramação. O citoplasma receptor precisa entre outras funções, fazer o remodelamento da cromatina da célula doadora de núcleo e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial.

Ovócitos em metáfase II (MII) são os mais utilizados na produção de embriões clone, porém, existem outras opções de citoplasma receptor que servem como alternativa. Com o objetivo de realizar uma ativação mais próxima da fisiológica, pesquisadores utilizaram ovócitos submetidos à fecundação *in vitro* por 4 horas, como citoplasma receptor, mostraram que a produção de embriões foi semelhante ao controle, porém o desenvolvimento pós-implantacional e taxa de nascimento foi superior a dos ovócitos ativados após a fusão (Schurmann *et al.*, 2006). Apesar de muitos trabalhos reportarem que o uso de ovócitos fecundados e/ou embriões de 2 células são adequados para a produção de embriões clones, é de conhecimento comum que essas estruturas são menos aptas a suportarem a reprogramação epigenética do núcleo transferido (Campbell *et al.*, 2007). Outra alternativa seria o uso de ovócitos ativados antes da transferência nuclear, entretanto os resultados mostraram que a ativação antes da TNCS não é viável (Tani *et al.*, 2001).

Considerando que a qualidade do ovócito é um importante fator no sucesso da TNCS, o uso de ovócitos maturados *in vivo* apresenta melhores resultados na TNCS do que os maturados *in vitro* (Ohkoshi *et al.*, 2003; Wells, 2010). Entretanto, Akagi e colaboradores (2008) não observaram diferença na taxa de blastocisto quando ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* foram comparados, porém as taxas de gestação e nascimento foram superiores com ovócitos maturados *in-vivo* (Akagi *et al.*, 2008). Apesar desses resultados, o uso de ovócitos maturados *in vivo* é trabalhoso, caro e impraticável para aplicação na rotina da TNCS.

Os ovócitos utilizados como citoplasma receptor na TNCS, em geral são obtidos de ovários de abatedouro ou de aspiração folicular de animais *in vivo*, em diferentes idades e condições fisiológicas, que podem influenciar sua capacidade de desenvolvimento (Wells, 2010). De fato, vários relatos indicam que ovócitos de bezerras têm menor capacidade de se desenvolverem a blastocistos comparadas aos de vacas e novilhas quando utilizados na PIVE,

na ativação partenogênética e na TNCS (Lévesque e Sirard, 1994; Damiani *et al.*, 1996; Majerus *et al.*, 2000; Oropeza *et al.*, 2004). Da mesma forma, o tamanho do folículo afeta a competência dos ovócitos, sendo que a taxa de blastocistos é maior nos ovócitos recuperados de folículos >6 mm, do que nos recuperados de folículos de 3 a 6mm, que por sua vez é maior que os de folículos 1 a 3 mm (Caixeta *et al.*, 2009).

Inúmeros trabalhos têm sido feitos visando aumentar a competência dos ovócitos maturados *in vitro* na tentativa de melhorar a qualidade e aumentar a produção de embriões por TRAs. Várias alternativas tem sido testadas em ovócitos destinados a TNCS e PIVE, como exemplo, utilizar os fatores secretados por ovócitos desnudos durante a maturação, através do co-cultivo desses com complexos *cumulus* ovócito (CCOs). Esse procedimento melhorou o desenvolvimento subsequente de embriões, apresentando no dia 7 de cultivo melhores taxas de blastocistos com maior número de células (Su, Wang, *et al.*, 2014). A adição de fatores de crescimento, como o GDF9 (Su, Hu, *et al.*, 2014), e antioxidantes, como o resveratrol (Lee *et al.*, 2015) também tem sido utilizado durante a maturação resultando em aumento nas taxas de blastocisto e número total de células de embriões clone (Lee *et al.*, 2015). Outra alternativa é o uso de agentes bloqueadores da meiose com o objetivo de conceder um tempo adicional para os ovócitos adquirirem maior competência, ou apenas viabilizar uma maior quantidade de ovócitos manipulados no mesmo dia (De Bem *et al.*, 2011; Dieci, C. *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015).

2.1.2 Célula doadora

Vários tipos celulares já foram utilizados na TNCS em bovinos, tais como células embrionárias (Keefer *et al.*, 1994), fibroblastos da pele (Cheng *et al.*, 2011), epitélio da glândula mamária (Liu *et al.*, 2013), células do *cumulus* (CC) (Akagi *et al.*, 2008), musculares (Green *et al.*, 2007) entre outras (Kato *et al.*, 2000). Atualmente é possível produzir embriões clones de diversos tecidos e de indivíduos em idades diferentes, porém, aproximadamente 12 dos 200 tipos de células existentes foram capazes de levar uma gestação a termo (Vajta e Gjerris, 2006).

A célula doadora de núcleo pode ser obtida de diversas fontes, entre elas, células em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, fetais ou de animais adultos. Ainda não está claro qual a célula ideal para a TNCS, porém o grau de diferenciação celular e o estágio do ciclo celular interferem no sucesso da produção de embriões clone (Kato, 1998; Kato *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2005; Vajta e Gjerris, 2006; Wells, 2010).

É possível produzir embriões viáveis a partir de células doadoras de núcleo em diferentes momentos do ciclo celular. Tani e colaboradores em 2001, produziram embriões com CC em todas as fases do ciclo celular exceto a fase S. Esses autores mostraram que usando células em G0/G1 é possível produzir embriões que se desenvolvam até o nascimento, porém quando se usa células em G2 os resultados são piores, pois ocorre maior formação de embriões tetraploides (Tani *et al.*, 2001).

É importante ressaltar, que o ovócito receptor em MII e a célula doadora de núcleo em G0/G1 devem estar em sincronia para que haja um aumento na eficiência da clonagem. Quando as células se encontram em G0/G1 são consideradas mais apropriadas para a reprogramação (Verma *et al.*, 2015). O tratamento com privação de soro antes da TNCS aumenta o número de células em G0/G1, porém, aumenta também o número de células em apoptose ou necrose (Hwang *et al.*, 2013). Esse tipo de tratamento pode ser substituído pelo cultivo das células até a confluência ou tratamentos com roscovitina, que apesar de apresentar menor número de células em G0/G1 em relação à privação de soro, tem a vantagem de apresentar um menor número de células em apoptose ou necrose, se mostrando a melhor alternativa para o cultivo de células destinadas a TNCS (Hwang *et al.*, 2013).

O uso de células somáticas diferenciadas pode ser eficaz na reprogramação epigenética, porém sabe-se que quanto mais diferenciada e quanto maior o período de cultivo dessas células, menor é a eficiência na TNCS. Isso mostra que células pluripotentes como blastômeros embrionários ou células tronco embrionárias suportam melhor o desenvolvimento, sendo mais eficientes na TNCS do que as células somáticas (Campbell *et al.*, 2007). Já as células tronco mesenquimais, extraídas da medula óssea por exemplo, mostraram um aumento nas taxas de blastocisto em relação aos fibroblastos em embriões suínos (Song *et al.*, 2015).

A maioria dos problemas encontrados em embriões clones é a incompleta ou incorreta reprogramação epigenética, tais como alteração na metilação do DNA ou modificações nas histonas (Niemann *et al.*, 2008). Portanto, o uso de substâncias que modificam o status epigenético, tais como inibidores da metilação do DNA e inibidores das histonas desacetilases (HDAC) tem sido utilizados para melhorar a eficiência da clonagem. A Tricostatina A, um inibidor da HDAC, causa um acúmulo de histona acetilada na célula e reduz a metilação do DNA. Já 5-aza-29-deoxycytidine (5-aza-dC) é um agente desmetilante de DNA, o que diminui os níveis de metilação do DNA (Enright *et al.*, 2003; Enright *et al.*, 2005). Braga em 2012, testou cultivo de fibroblasto com procaina e S-adenosil -L-homocisteína (SAH)

utilizadas para desmetilar DNA em fibroblastos destinadas a TNCS. O autor não observou diferença nos níveis de metilação nas células tratadas com essas substâncias (Braga, 2012).

2.1.3 Enucleação, reconstrução e ativação dos ovócitos

Na TNCS o DNA é removido de um ovócito maturado e logo após é feita a introdução do núcleo da célula doadora, normalmente no espaço perivitelino, e em seguida suas membranas são fusionadas. Para a enucleação o método mais comum é a aspiração com o auxílio de micromanipuladores, o que exige equipamentos específicos e habilidade do micromanipulador. Com auxílio de duas pipetas de vidro, uma fixa o ovócito na posição desejada (pipeta *holding*), e uma segunda de aspiração que irá remover o corpúsculo polar (CP) juntamente com uma porção adjacente do citoplasma, onde se encontra a placa metafásica. A reconstrução é feita com a deposição de uma célula doadora de núcleo no espaço perivitelino seguido por eletrofusão para incorporar o DNA da célula ao citoplasma receptor. Para induzir a retomada da meiose, utiliza-se uma ativação elétrica ou química que irá promover um influxo de cálcio no ovócito que vai estimular a retomada do ciclo celular (Vajta e Gjerris, 2006; Niemann e Lucas-Hahn, 2012).

A enucleação também pode ser feita manualmente como no *Hand Made Cloning* (HMC) ou quimicamente como é feito na técnica *Zone Free* (Vajta e Gjerris, 2006; Hosseini *et al.*, 2015). O HMC dispensa a utilização de micromanipuladores, fazendo com que a produção de embriões clone tenha um menor custo. Essa técnica consiste na divisão manual do ovócito com uma lâmina, eliminando a hemimetade que contém o material genético. São utilizadas duas hemimetades, que agregam a célula doadora de núcleo para reconstrução dos prováveis zigotos (Vajta *et al.*, 2001). Essa técnica requer o cultivo individual dos embriões a fim de evitar agregação embrionária (Tecirlioglu, 2005; Vajta e Gjerris, 2006). Estudo comparando a HMC e a TNCS clássica mostrou não haver diferença entre as técnicas quanto à produção de embriões (Tecirlioglu, 2005).

Além da HMC, ainda existe uma técnica muito semelhante, denominada *Zone Free*, que utiliza substâncias químicas para promover a enucleação. A comparação entre a Demecolcina, Citocalasina B e MG-132, não mostrou diferença nas taxas de clivagem e blastocisto. Entretanto o uso da Demecolcina reduziu o tempo necessário para executar a enucleação dos ovócitos. (Hosseini *et al.*, 2015). Moura e colaboradores (2008), avaliaram a utilização da actinomicina D como método alternativo para a enucleação química e mostraram

que apesar de induzir inativação dos cromossomos, essa substância causa uma redução drástica na taxa de blastocisto (Moura *et al.*, 2008).

A ativação dos ovócitos é fundamental para que possam retomar as divisões celulares, simulando o que o espermatozoide faz *in vivo* quando fecunda o ovócito. Portanto, no caso da TNCS é necessário induzir artificialmente a ativação. Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para ativar os ovócitos, tais como estímulo elétrico ou ativação química (estrôncio, ionomicina e ionóforos de cálcio). Em geral, essas substâncias são associadas à ciclohexamida (CHX) ou 6-dimetilaminopurina (6-DMAP). A maioria dos trabalhos utiliza a ionomicina ou ionóforos de cálcio, para promoverem a mobilização de Ca^{2+} intracelular, promovendo um fluxo regular semelhante ao fisiológico. O Ca^{2+} inativa o Fator Citostático (CSF), suprimindo a atividade do fator promotor de maturação (MPF). Em seguida, é administrado o CHX ou 6-DMAP para impedir a retomada da atividade da MPF (Campbell *et al.*, 2007).

Objetivando avaliar o efeito de repetitivos tratamentos com ionomicina na produção de embriões clones, Kim e colaboradores (2012) mostraram que o grupo tratado com maior número de repetições em menor tempo teve as melhores taxas de blastocisto em D7. Esses autores também mostraram que os embriões tiveram melhor desenvolvimento devido à queda na incidência de células apoptóticas (Kim *et al.*, 2012). Como alternativa ao 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) e a ciclohexamida para a ativação foi proposto o uso de anisomicina cujos resultados mostraram aumento nas taxas de blastocistos, melhora na qualidade dos embriões e diminuição na porcentagem de anormalidades cromossômicas (Felmer e Arias, 2015).

2.1.4 Cultivo embrionário

Outro fator crítico para o resultado da TNCS é o cultivo embrionário, já que após a ativação os possíveis zigotos são cultivados por sete dias antes de serem transferidos para receptoras. Os sistemas de cultivo utilizados para embriões TNCS são basicamente os mesmos utilizados para embriões PIVE. Tentativas para melhorar a eficiência do desenvolvimento de embriões PIVE e TNCS, resultaram em uma grande variedade de sistemas de cultivo *in vitro* (Campbell *et al.*, 2007). Quando o co-cultivo de prováveis zigotos de TNCS foi feito com ovócitos PA foi observado um aumento nas taxas de clivagem e blastocistos nos dois tipos embrionários (Saadeldin *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que os embriões liberam substâncias que beneficiam o desenvolvimento embrionário.

Existem vários meios de cultivo que suportam o desenvolvimento embrionário, tais como o Fluido Sintético de Oviduto (SOF), meio sequencial (CR1aa), meio de otimização simples de potássio (KSOM). Entretanto, a maioria dos trabalhos utilizam o SOF como meio de cultivo para embriões TNCS, com apenas algumas variações na composição para melhorar os resultados (Arias *et al.*, 2013). Entretanto, o sistema de cultivo utilizado ainda não é o ideal considerando que, nas melhores condições, a taxa de blastocisto tanto para embrião PIVE quanto para TNCS está em torno de 40%.

Outra variação nos meios de cultivo embrionários se refere a fonte proteica utilizada. As fontes de proteína mais utilizadas no meio de cultivo de embriões clones são o soro fetal bovino (SFB) ou a albumina sérica bovina (BSA). Arias e colaboradores (2013) mostraram que a adição do SFB no meio de cultivo embrionário, a partir do terceiro dia aumentou as taxas de clivagem e blastocistos de embriões clone comparados aos cultivados somente na presença de BSA (Arias *et al.*, 2013). Já a suplementação do meio com Trolox, uma substância antioxidante, aumentou as taxas de blastocistos e número total de células de embriões clones (Lee *et al.*, 2015). O Trolox reduziu os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentando os níveis de Glutathione o que induziu uma queda nos níveis de expressão de genes relacionados a apoptose e aumento na expressão de genes relacionados à qualidade embrionária. Esses resultados indicaram que a adição ou substituição de componentes no meio pode ser uma ferramenta para melhorar as taxas de produção de embriões (Lee *et al.*, 2015).

Assim como as células doadoras, os prováveis embriões também podem ser expostos a modificadores epigenéticos como a tricostatina A, com o objetivo de aumentar a taxa de produção (Beebe *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Whitworth *et al.*, 2015). Beebe e colaboradores (2009) cultivando os prováveis zigotos clonados com tricostatina A por 24 horas após a ativação, produziram três vezes mais embriões no grupo tratado do que no grupo controle (Beebe *et al.*, 2009).

2.1.5 Aplicações da clonagem

As áreas de aplicação da TNCS podem ser agrupadas em três: clonagem reprodutiva, clonagem terapêutica e pesquisa básica.

A pesquisa básica visa compreender melhor a reprogramação epigenética, pluripotência das células, produção de animais transgênicos, dentre outros (Niemann e Lucas-Hahn, 2012). Uma das alternativas mais importantes seria a produção de animais como modelo para estudo de doenças humanas e animais, permitindo assim testar medicamentos ou

tratamentos alternativos antes de aplicar nos seres humanos. O suíno e ovino são os modelos ideais por terem semelhanças com o humano, como o tamanho dos órgãos e a fisiologia. Para estabilizar um modelo de estudo da Diabetes Mellitus Neonatal Permanente, pesquisadores geraram um suíno que reproduzia a doença em seu organismo. Concluíram que esse modelo era atrativo para o estudo da suplementação de insulina e as consequências do desenvolvimento da doença (Renner *et al.*, 2013).

Se tratando de clonagem reprodutiva, os trabalhos procuram melhorar de alguma forma os resultados da técnica que por sua vez ainda se mostram baixos. A TNCS surge como uma alternativa de produção de animais em risco de extinção, utilizando a TNCS interespecies. Utilizando células de bovinos e búfalos, Lu e colaboradores (2005) avaliaram a possibilidade de produção de embriões com células de animais de espécies diferentes. Concluindo que o ovócito de bovinos como citoplasma receptor é mais eficiente para gerar embriões, independente da espécie, búfalo ou bovino, do doador de núcleo (Lu *et al.*, 2005). Ainda nessa mesma linha de estudos, um trabalho feito utilizando células somáticas de gatos selvagens e ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, de gatos domésticos, mostrou ser possível a produção de animais clones utilizando a TNCS interespecies e que o gato doméstico é capaz de gerar animais clone saudáveis (Gómez *et al.*, 2004).

Na clonagem terapêutica, a aplicação que tem demonstrado mais interesse entre os grupos de estudos é produção de animais transgênicos como biorreatores, para produção de proteínas utilizadas em tratamento de doenças humanas e animais. O trabalho de Liu e colaboradores (2013) concluiu que a habilidade de gerar embriões transgênicos com gene de resistência à mastite β -defensina-3 de humanos com células de epitélio da glândula mamária transfectadas não foi comprometido quando comparado com epitélio não transfectado, mostrando ser possível a produção de cabras transgênicas por TNCS (Liu *et al.*, 2013). Reggio e colaboradores (2001) utilizaram em seu trabalho células de um feto transgênico carregando o gene para produção da antitrombina III humana como marcador, com objetivo de avaliar as taxas de fusão e desenvolvimento *in vivo* de embriões clones produzidos por TNCS, através da fusão de fibroblastos transgênicos com ovócitos estimulados com Hormônio Folículo Estimulante (FSH) ou não (de abatedouro). Não houve diferença na produção de descendentes entre os dois tipos de ovócitos e a técnica demonstrou ser efetiva para produzir animais saudáveis (Reggio *et al.*, 2001).

2.2 Maturação Ovocitária

A maturação é o processo pelo qual o ovócito se prepara para a fecundação e, refere-se às mudanças nucleares e citoplasmáticas, que o torna capaz de originar uma nova vida. O processo da formação do ovócito é chamado de ovogênese e inicia-se durante a vida fetal (Fair, 2003), mas só termina após a fecundação. Os ovócitos têm origem extragonadal e são formados a partir de células germinativas primordiais, que após chegarem ao local onde as gônadas vão se formar, se diferenciam em ovogônias. Antes do nascimento essas entram em meiose e ficam retidas no estágio de prófase I (Austin e Short, 1982). Durante todo o período de desenvolvimento folicular o ovócito permanece retido no estágio de diplóteno da prófase I, e só é estimulado a retomar e completar a primeira divisão meiótica, após o pico pré-ovulatório de LH. Portanto, quando liberado do folículo na ovulação, o ovócito encontra-se no estágio de metáfase da segunda divisão meiótica, é, então retido pela segunda vez (Austin e Short, 1982). O término da maturação meiótica do ovócito só ocorre após a penetração do espermatozoide durante a fecundação.

A maturação ovocitária envolve várias mudanças nucleares e citoplasmáticas. A maturação nuclear está relacionada à segregação dos cromossomos, e envolve a progressão da meiose da fase de Prófase I até o estágio de Metáfase II. Durante o desenvolvimento folicular, os ovócitos encontram-se retidos em diplóteno da prófase I, com o núcleo em Vesícula Germinativa (VG), que tem como característica a cromatina descondensada e membrana nuclear íntegra (Liu *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2009). Quando ocorre a retomada da meiose, a membrana da VG se dissolve, comumente chamada de quebra da VG (VGBD - Vesicle Germinal Break down), e inicia a condensação dos cromossomos, passando para as fases de Metáfase I, Anáfase I, e Telófase I, finalizando a primeira divisão meiótica. A divisão e expulsão dos cromossomos homólogos é acompanhada por uma divisão desigual de citoplasma, denominada de corpúsculo polar (CP), e o ovócito entra na segunda divisão meiótica chegando à Metáfase II, onde fica retido pela segunda vez. A segunda divisão meiótica só se concluirá se houver fecundação.

A maturação citoplasmática, que inclui a maturação molecular, envolve a reorganização das organelas, acúmulo de mRNAs, síntese de proteínas e fatores de transcrição que serão utilizados durante o processo de maturação, fecundação e desenvolvimento inicial do embrião (Ferreira *et al.*, 2009; Auclair *et al.*, 2013).

Moléculas e substâncias são transportadas através das células do cumulus (CC) para o ovócito pelas Junções Gap (GJ-Gap Junctions), permitindo uma troca bidirecional de

pequenas moléculas como ATP, íons e suprimento energético pelo metabolismo de açúcares e lipídios fora do ovócito (Auclair *et al.*, 2013). À medida que o ovócito progride na configuração da cromatina, a produção e armazenamento de mRNA diminui até ocorrer o silenciamento genômico no final do crescimento folicular. Esses mRNAs serão utilizados para síntese de proteínas e na fase inicial do desenvolvimento, até o embrião atingir o estágio de 8-16 células, que é o momento em que ocorre a transição materno-zigótica e o embrião passa a traduzir seu próprio genoma (Lodde *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009).

As mitocôndrias são responsáveis por suprir os gastos energéticos dos ovócitos através da produção de ATP, se posicionando nos locais de maior gasto energético durante a maturação (Ferreira *et al.*, 2009). O padrão de atividade das mitocôndrias vai variar de acordo com a aquisição de competência ovocitária, crescimento e atresia (Jeseta *et al.*, 2014). São responsáveis pela produção de ATP na maturação para que o ovócito possa suportar a aquisição de competência e os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Primeiramente se posicionam periféricamente no ovócito e, quando atingem a MII se tornam mais próximas do núcleo, acompanhando a necessidade de cada fase. Quando o ovócito está imaturo, o complexo de golgi (CG) se posiciona periféricamente, e posteriormente se posiciona em uma área nuclear. Os Grânulos Corticais (GC), que são produzidos no CG, se encontram na região nuclear e durante a maturação migram para a periferia do ovócito. Com a ativação do ovócito pelo espermatozóide o conteúdo desses grânulos é liberado, modificando a zona pelúcida impedindo a entrada de outros espermatozoides, evitando a polispermia. (Ferreira *et al.*, 2009; Jeseta *et al.*, 2014).

2.3 Controle da Maturação

O fator responsável para que o ovócito seja mantido no estágio de VG, dentro do folículo, é a concentração elevada de cAMP intraovocitária. As concentrações de cAMP são reguladas pela Adenilato Ciclase (AC), que produz o cAMP a partir de Adenosina trifosfato (ATP). Outro importante regulador do cAMP são as fosfodiesterases (PDEs), que são responsáveis pela degradação do cAMP (Tripathi *et al.*, 2010). Existem vários tipos de PDEs, a fosfodiesterase 3A (PDE3A), em bovinos, é específica do ovócito, enquanto a PDE tipo 4 está envolvida no metabolismo de cAMP nas células da granulosa (Tsafiriri *et al.*, 1996).

Outro fator importante na manutenção dos ovócitos em VG é o monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), produzido pelas CC e transferido para o ovócito pelas GJ. No ovócito

o cGMP inibe a atividade da PDE3A, evitando a degradação do cAMP do ovócito e a retomada da meiose (Blaha *et al.*, 2015).

In vivo, o ovócito é estimulado a retomar a meiose somente após o pico de LH, que age nas células da granulosa mural do folículo, e induz a liberação da ampiregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC) que são fatores semelhantes ao Fator de Crescimento Epidermal (EGFs) (Tripathi *et al.*, 2010). Esses fatores se ligam ao receptor de EGF nas CC e ativam a via da proteína mitogênica cinase ativada (MAPK) (Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2006), e interrompendo a comunicação das CCs com o ovócito, fosforilando a conexina 43, provocando o fechamento das GJs. Com esse fechamento, diminuí o transporte de cAMP para dentro do ovócito. Além disso, a concentração cGMP cai e a PDE3A que estava inibida se torna ativa e degrada o cAMP. Com a queda dos níveis de cAMP, ocorre a desfosforilação do MPF, que se torna ativa e induz a retomada da meiose (Tripathi *et al.*, 2010).

In vitro, a retomada da meiose inicia após a remoção do ovócito do ambiente folicular e é descrita como retomada espontânea da meiose. Isso porque o transporte do cGMP, um inibidor de PDE3A que é produzido nas células somáticas, é interrompido afetando os níveis de cAMP. Uma vez o ovócito é retirado do ambiente folicular, os níveis de cGMP caem, ativando a PDE3A causando uma diminuição nos níveis de cAMP, provocando uma desfosforilação da PKA ativando o MPF (Tripathi *et al.*, 2010).

2.4 Retenção da Meiose

A retenção meiótica possibilita bloquear a retomada da meiose, que ocorre logo após a retirada do ambiente folicular, através da utilização de inibidores evitando assim o envelhecimento do ovócito concedendo mais tempo para que possa adquirir melhor capacidade de se desenvolver. Luciano e colaboradores (2011) cultivaram ovócitos de folículos pequenos (0,5-2mm) com substâncias que bloqueiam a retomada da meiose mantendo as GJs abertas. Esses autores mostraram que durante o período de retenção, houve um remodelamento da cromatina, comprovando que esses ovócitos tiveram um tempo a mais para adquirir uma maior competência para o desenvolvimento (Luciano *et al.*, 2011a). A retenção da meiose é uma ferramenta que possibilita fornecer um tempo maior para que possam se tornar mais competentes.

Várias substâncias que agem em etapas distintas da via que mantém o MPF inativo podem ser utilizadas para reter a retomada da meiose. Dentre essas podem ser usadas

substâncias que inibam especificamente a fosforilação de proteínas CDKs, como a roscovitina e butirolactona I (Adona e Leal, 2004; Adona *et al.*, 2008b; a), as que mantêm alta concentração de cAMP intra-ovocitária, como a 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), cilostamida (Guimaraes *et al.*, 2015a; b) e NPPC (Zhang *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015), as que inibam a síntese proteica de maneira não específica, como a cicloheximidina (Meinecke *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2011) e as que inibam as proteínas quinases, específicas como a dimetilaminopurina (6-DMAP) (Dode e Adona, 2001).

A ciclohexamida e a butirolactona I já foram utilizadas na retenção de ovócitos destinados a produção de embriões clones de suínos (Marques *et al.*, 2011) e bovinos (De Bem *et al.*, 2011), respectivamente. Em ambos os relatos, houve melhora na qualidade dos embriões clones e PA. O uso de Roscovite por 32 horas de PM em ovócitos bovinos, não afetou o desenvolvimento embrionário tanto na PIVE como na TNCS e PA, sendo as taxas de blastocisto semelhantes para todos os grupos (Lagutina *et al.*, 2002).

Muitos estudos têm utilizado a cilostamida, um inibidor da (PDE-3A), que é específico do ovócito e responsável pela hidrólise do cAMP, para fazer PM de ovócitos (Shu *et al.*, 2008; Jee *et al.*, 2009; Vanhoutte *et al.*, 2009; Luciano *et al.*, 2011a; Dieci, Cecilia *et al.*, 2013; Guimaraes *et al.*, 2015a; b). A vantagem de usar um inibidor específico do ovócito, é que mantém os níveis de cAMP no ovócito sem afetar as CC (Sasseville *et al.*, 2009a).

Dieci e colaboradores em 2013, avaliaram o efeito da PM com cilostamida em ovócitos destinados a TNCS, quanto aquisição de competência, manutenção das GJs e configuração de cromatina em suínos. Os autores relataram que a PM com cilostamida aumentou a produção de embriões PA e melhorou a qualidade de embriões TNCS, comparada ao controle. Em bovinos não existem relatos do uso de cilostamida para a PM de ovócitos a serem utilizados na TNCS (Dieci, C. *et al.*, 2013).

Recentemente, o NPPC tem recebido especial atenção dos grupos que trabalham com PM. Essa substância é naturalmente produzida pelas células da granulosa mural, se liga à seus receptores NPR1 e NPR2 que estão conjugados com a guanilato ciclase, e estimulam a liberação de cGMP, que através das GJs chega ao ovócito e bloqueia a atividade da PDE3A, mantendo as concentrações de cAMP elevadas.

Com o objetivo de comparar o NPPC com a cilostamida, pesquisadores avaliaram a retenção meiótica, a manutenção das GJs e a configuração da cromatina dos ovócitos tratados (Franciosi *et al.*, 2014). Esses autores observaram que o NPPC pode ser utilizado para reter a meiose e que aumenta a competência para o desenvolvimento de ovócitos bovinos quando

utilizados na PM (Franciosi *et al.*, 2014). Nenhum relato na literatura mostra o uso dessa substância em ovócito destinados a TNCS, em nenhuma das espécies domésticas.

CAPITULO 2

BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONES POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

RESUMO

BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONES POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Felippe Manoel Costa Caixeta¹, Ivo Pivato²

¹Médico Veterinário, Brasília-DF, Brasil, ²Professor Dr., Brasília-DF, Brasil

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do bloqueio meiótico utilizando inibidores da fosfodiesterase do tipo 3A (PDE 3A) na produção de embriões clones. Para tanto, foram realizados dois experimentos utilizando dois inibidores da retomada da meiose: cilostamida, um inibidor específico da fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3A), e o Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC), um sinalizador para liberação de guanilato ciclase (cGMP) que bloqueia a atividade da PDE3A. Ovócitos provenientes de ovários de abatedouro foram divididos em dois grupos para cada experimento: Controle (maturação por 20 horas) e Pré-Maturados (PM) por 6 horas com 5 μ M de cilostamida ou 100 nM de NPPC e, posteriormente maturados por 20 horas. Os ovócitos foram avaliados quanto à cinética de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário na produção *in vitro* de embriões (PIVE) e na clonagem por TNCS e, número total de células. Para a avaliação da TNCS em cada tratamento, foi adicionado um grupo controle que foi ativado partenogeneticamente (PA). Os resultados foram avaliados pelo teste de Chi-quadrado e Kruskal-Wallis com $P < 0.05$ considerado como significativo. No primeiro experimento, em que a PM foi realizado com 5 μ M de cilostamida, aproximadamente 87,8% dos ovócitos submetidos a PM se mantiveram em estagio de Vesícula Germinativa (VG) após 6 horas de PM, confirmando o bloqueio meiótico. Quanto ao desenvolvimento embrionário na PIVE, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle e PM quanto à taxa de clivagem em D2 (78,2% e 76,9%) e Blastocisto em D7 (35,5% e 29,3%). No desenvolvimento embrionário após a TNCS, a PM não afetou a taxa de clivagem em D2 (66% e 51,9%) dos grupos controle e PM respectivamente, mas causou uma redução ($P < 0,05$) na taxa de blastocisto em D7 (7,4% e 30,2%, respectivamente). No segundo experimento, foi utilizado NPPC para a PM dos ovócitos, sendo que após 6 horas de PM 84,9% estavam em estagio de VG. Quanto ao desenvolvimento embrionário na PIVE, os grupos controle e PM apresentaram taxa de clivagem em D2 (76,4% e 77,8%) e de blastocisto em D7 (48,3% e 45,6%) semelhantes ($P > 0,05$). Na clonagem por TNCS, não houve diferença

($P > 0,05$) na taxa de clivagem (69,2% e 68,4%) e de blastocisto (24,4% e 21,5%) entre o PM e controle. Os embriões clones e PA dos grupos PM e controle não diferiram quanto ao número total de células ($P > 0,05$). Conclui-se que a PM por 6 horas com 100 nM de NPPC é viável para a produção de embriões clones sem efeito deletério na qualidade e nas taxas de produção.

Palavras chave: Pré-maturação, cilostamida, transferência nuclear com células somáticas, retenção meiótica.

ABSTRACT

MEIOTIC ARREST AS AN ALTERNATIVE TO INCREASE PRODUCTION OF CLONED EMBRYOS BY NUCLEAR TRANSFER

Felippe Manoel Costa Caixeta¹, Ivo Pivato²

¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²PhD, Brasília-DF, Brazil

This study aimed to evaluate the effect of meiotic arrest using phosphodiesterase type 3A (PDE 3A) inhibitors in the production of clones embryos. Two experiments were performed using two inhibitors of meiotic resumption: cilostamide, a specific inhibitor of phosphodiesterase type 3 (PDE3A), and natriuretic peptide type C (NPPC), a peptide that induces the production of guanylate cyclase (cGMP) that blocks the activity of PDE3A. Oocytes obtained from slaughterhouse ovaries were divided into two groups for each experiment: control (maturation for 20 hours) and Pre-Maturarion (PM) for 6 hours with 5 μ M of cilostamide or 100 nM of NPPC and then maturation for 20 hours. The oocytes were evaluated for nuclear maturation, embryonic development after *in vitro* embryo production (IVP), and after SCNT, and total cells number. For SCNT evaluation in each treatment a control group that was activated parthenogenetically (PA) was added. The results were evaluated by Chi-square and Kruskal-Wallis test with $P < 0.05$ considered significant. In the first experiment, where the PM was carried out with 5 μ M of cilostamide, approximately 87.8% of the oocytes that have undergone PM remained at germinal vesicle stage (GV) after 6 hours of PM, confirming the meiotic block. Embryo development in IVP was similar ($P > 0.05$) between control and PM, either for cleavage rate on D2 (78.2% and 76.9%) or blastocyst rate on D7 (35, 5% to 29.3%). After SCTN, cleavage rate on D2 was also similar ($P > 0.05$) between control and PM (66% and 51.9%) however, blastocyst rate on D7, was much lower ($P < 0.05$) in PM than on control group (7.4% and 30.2%). In the second experiment, NPPC was used for 6 hours of PM. After PM approximately 84.9% of the oocytes remained at VG stage. Results of IVP showed no difference between control and PM on cleavage (76.4% and 77.8%) and blastocyst rates (48.3% and 45.6%). Similarly, no differences between PM and control groups were observed for cleavage (69.2% and 68.4%) and blastocyst (24.4% and 21.5%) rates. SCNT and PA embryos from control or PM oocytes showed no differences in the total cell number. It can be concluded that PM for 6 hours with

100nM NPPC is feasible for embryos cloned production without deleterious effect on the outcome and embryo.

Keywords: pre-maturation, cilostamide, Somatic Cell Nuclear Transfer, meiotic arrest.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos nas biotécnicas da reprodução animal, a clonagem por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ainda apresenta uma baixa eficiência. Em bovinos, apesar das taxas de produção de blastocisto serem semelhantes às obtidas na produção *in vitro* de embriões (PIVE), variando entre 20% e 40% em D7 (Kato *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2013; Iwamoto *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015), apresentam um alto índice de perda fetal no início da gestação. Essas perdas, em geral, ocorrem na fase de placentação e estão muito relacionada às alterações epigenéticas, decorrentes de falhas na reprogramação das células doadoras já diferenciadas (Campbell *et al.*, 2007). Considerando que em bovinos apenas 11% dos embriões produzidos e transferidos chegam a termo (Keefer, 2015), até que os problemas relacionados às alterações epigenéticas sejam resolvidos, para se aumentar a produção de produtos clonados é necessário aumentar o número de embriões produzidos. O que nos leva a enfrentar dois problemas: um refere-se à maturação *in vitro* (MIV), já que ovócitos quando retirados dos folículos retomam espontaneamente a meiose e não passam pela chamada “capacitação ovocitária”, essencial para que o ovócito tenha total competência para o desenvolvimento (Luciano *et al.*, 2011a). O segundo se refere ao número limitado de ovócitos que um técnico tem condições de micromanipular, de forma eficiente na rotina da clonagem.

Uma das formas de tentar melhorar a qualidade e disponibilizar uma maior quantidade de ovócitos para micromanipulação seria através do bloqueio meiótico. Esse procedimento possibilita bloquear a retomada espontânea da meiose, através da utilização de inibidores do fator promotor da metáfase (MPF), como a ciclohexamida e a roscovitina (Barretto *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2011), ou inibidores da fosfodiesterase como a cilostamida, 3-isobutyl-1-metilxantina (IBMX), peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), entre outros (Barretto *et al.*, 2011; Dieci, C. *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; Guimaraes *et al.*, 2015b; a).

A cilostamida tem sua ação direta na PDE3A, que é responsável pela hidrólise do cAMP, que em níveis altos, impede a retomada da meiose. Essa substância quando utilizada na retenção de ovócitos suínos, que foram micromanipulados para a produção de clones, aumentou a qualidade dos embriões (Dieci, C. *et al.*, 2013). Já o NPPC é um agente natural produzido pelas células da granulosa mural, que age nas células do *cumulus* (CC) estimulando a liberação de cGMP, que por sua vez, bloqueia a atividade da PDE3A no ovócito (Zhang *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Hiradate *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015). Essas substâncias têm sido extensivamente utilizadas para fazer a pré-maturação (PM) de ovócitos bovinos a serem utilizados na PIVE, na tentativa de aumentar a competência ovocitária e o desenvolvimento embrionário (Albuz *et al.*, 2010a; Dieci, C. *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; De Cesaro *et al.*, 2015; Farghaly *et al.*, 2015; Guimaraes *et al.*, 2015b; a; Zhong *et al.*, 2015).

Aumento na produção e qualidade de embriões PIVE tem sido relatado por alguns autores (Gilchrist e Thompson, 2007; Vanhoutte *et al.*, 2008). Apesar de não existir um consenso de quanto esse procedimento melhora a MIV, existe uma concordância quanto a não ter um efeito deletério (Franciosi *et al.*, 2014; Guimaraes *et al.*, 2015a). Portanto, esse procedimento seria de grande valia para a rotina da clonagem, pois mesmo que não haja melhora na qualidade do ovócito, permite a utilização de grande número de ovócitos em um mesmo dia sem que haja o envelhecimento devido ao tempo de manipulação. Apesar disso, trabalhos que utilizam a PM em ovócitos para a clonagem são muito escassos, sendo que não existem relatos do uso da cilostamida e do NPPC na TNCS em bovinos.

Portanto, o presente experimento teve como objetivo a utilização do bloqueio meiótico como alternativa para melhorar a qualidade e aumentar a quantidade de ovócitos disponíveis para micromanipulação em bovino.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Reagentes e Produtos Químicos

Os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma (Sto. Louis, MO, USA).

1.2 Recuperação e Seleção dos Ovócitos

Ovários de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) foram coletados em abatedouro local imediatamente após o abate e, transportados até o laboratório de reprodução animal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias, em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/mL e penicilina G - 100UI/mL) à temperatura de 35-36°C. O tempo do abate até o início da aspiração dos folículos não ultrapassou o período de 4 horas.

Foram aspirados folículos de 3-8 mm de diâmetro com seringas de 10 mL e agulhas 18G e, o conteúdo folicular foi depositado em tubos plásticos de 15 mL (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça). Após a sedimentação do conteúdo, foram removidos 10 mL de líquido folicular sobrenadante que foram centrifugados por 5 minutos à 700g e, utilizados para procura e seleção dos complexos *cumulus* ovócitos (CCOs). Foram utilizados no experimento apenas CCOs que possuíam quatro ou mais camadas de CC e citoplasma homogêneo.

1.3 Pré-Maturação (PM) e Maturação (MIV) dos Complexos *Cumulus* Ovócitos (CCOs)

Para a PM, os CCOs selecionados foram transferidos para meio pré-MIV, composto por TCM-199 (GIBCO®) com sais de Earle's suplementado com 0,075mg/mL de Amicacina, 0,2% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF), 0,68 mM de L-glutamina, 1µM de Piruvato de Sódio, 0,1µM de Cisteamina e 10⁻⁴UI/mL de FSH recombinante [rFSH (Gonal-F®, Merck Serono, Rockland, MA, USA)], acrescidos de 5µM de cilostamida ou de 100µM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC). Foram cultivados em gotas de 200µl por um período de 6 horas, coberta com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING®, New York, Canton, USA), à 38,5°C e 5% de CO² em ar e, posteriormente foram maturados *in vitro*.

A MIV foi realizada em gotas de 200µL de meio de MIV, contendo de 25 a 30 CCOs/gota, por um período 20 horas, à 38,5°C ,5% de CO₂ em ar. O meio de MIV consistiu de TCM 199 sais de Earl's (GIBCO®) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco®), 12 UI/mL de Hormônio Luteinizante (LH), 0,01 UI/mL de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) 0,1 mg/mL de L-glutamina, 0,075 mg/mL de Amicacina, 0,1µM/ml de Cisteamina e 0,2mM de Piruvato de Sódio. As gotas de cultivo eram cobertas com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING®, New York, Canton, USA).

1.4 Seleção e Preparo dos Ovócitos para Micromanipulação

Após 20 horas de cultivo, os CCOs foram removidos do meio de MIV e foram transferidos para uma gota de 200µl de solução de Hialuronidase a 0,2%, em TCM199 Hank's. Os CCOs retornaram a estufa por 5 minutos e, posteriormente foram submetidos a repetidas pipetagens, para completa remoção das CC Os ovócitos foram então selecionados quanto à presença do corpúsculo polar (CP), e homogeneidade do citoplasma. Aproximadamente 40 a 50 ovócitos selecionados foram depositados em gotas de 50µl de solução de meio MIV contendo Citocalasina D (2,5mg/mL) e Hoechst 3342 (1mg/mL), onde foram mantidos por 30 minutos à 38,5°C , 5%CO₂ em ar. Logo após, os ovócitos foram transferidos em grupos de cinco para gotas de 30 µL de meio de lavagem (LAV), constituído de TCM-199 com sais de Hank's, suplementado com 10% SFB e Amicacina 0,075 mg/mL, cobertas com óleo mineral testado em embriões de camundongo, em uma tampa da placa de

100mm (CORNING®, New York, Canton, USA) previamente preparada para a micromanipulação (Figura 1).

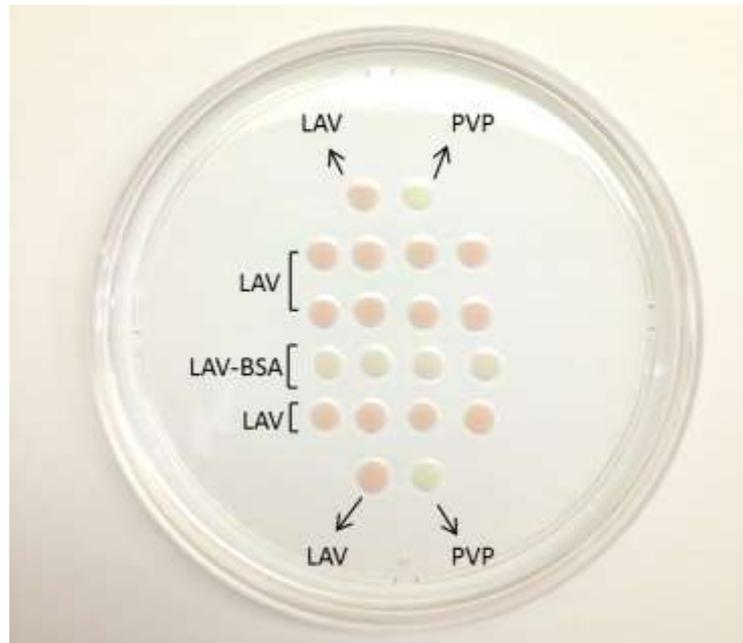


Figura 1. Representação Esquemática da Placa de Micromanipulação. LAV = Meio de Lavagem; LAV-BSA= Meio de lavagem suplementado com BSA, solução TCM Hank's sem cloridrato de Cálcio e sulfato de Magnésio com 0,0200g de albumina sérica bovina; PVP = Meio de Lubrificação das Pipetas de micromanipulação.

Nas gotas de LAV dispostas em 3 fileiras, eram depositados 5 ovócitos em cada uma, onde foram manipulados. Nas gotas de LAV-BSA, eram depositadas as células somáticas doadoras de núcleo. As gotas sobressalentes de LAV e as gotas de PVP eram usadas para lavagem e lubrificação das pipetas de micromanipulação, respectivamente.

1.5 Cultivo e preparo de Células Somáticas

Fibroblastos provenientes de biopsia de pele de um macho Nelore adulto, foram utilizados como células doadoras de núcleo. Após ser estabelecido o cultivo dos fibroblastos, as passagens 1, 2, 3 e 4 foram congeladas em meio Dubelcco's Minimum Eagle Medium (DMEM-GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO). Uma semana antes da manipulação, uma palheta foi descongelada a 37-38°C. O

conteúdo da palheta foi depositado em garrafas de 25cm², contendo meio de cultivo DMEM a 38,5° C, 5 % de CO₂ em ar, até a confluência, que coincidia com o dia da manipulação.

No dia da manipulação, após retirar e descartar o meio de cultivo, a garrafa foi lavada com 500µL de solução de tripsina a 0,05% e, após ser adicionado 1000µL da mesma solução, retornou a estufa por 5 min. A solução de tripsina com as células foi então centrifugada por 5 minutos à 1700rpm, o sobrenadante retirado, e o pellet foi resuspendido com 400µL de LAV-BSA. Finalmente, 30µL dessa solução foi adicionada em 200µL de LAV-BSA, formando a solução final. 7 µL da solução final contendo as células foi depositado em 4 gotas de 30µL de LAV-BSA dispostas na placa de micromanipulação (Figura 1).

1.6 Transferência Nuclear com Células Somáticas

Para a micromanipulação, os ovócitos foram fixados individualmente à pipeta *holding* feita com capilar de vidro, de forma que o corpúsculo polar permanecesse na posição de 4 h. A enucleação foi realizada com auxílio de uma pipeta de aspiração de vidro com diâmetro de 15-20 µm, com a qual foi aspirado o corpúsculo polar e uma porção do citoplasma adjacente. Em seguida, uma célula somática previamente tripsinizada e diluída, foi depositada no espaço perivitelino, para a reconstrução. As estruturas foram então transferidas para solução de D-Manitol à 0,28 M contendo 0,1 mM de MgSO₄, e foram submetidas ao processo de eletrofusão em fonte ECM 200 (BTX®). A eletrofusão foi realizada em câmara de fusão através da geração de dois pulsos elétricos com carga de 2,1kVA/cm, com 30 µs de duração. Logo após, os ovócitos retornaram ao meio MIV, onde foram mantidos por 30 minutos, para posterior avaliação da fusão.

As estruturas fusionadas foram ativados pela incubação por 5 min em solução LAV contendo Ionomicina (5 µM) e, posteriormente, por 4 horas em meio de cultivo embrionário Fluido Sintético de Oviduto, suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sodium tri citrato 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (Gibco) (SOFaaci– Holm et al., 1999), contendo 6DMAP 2 µM.

Simultaneamente aos ovócitos micromanipulados, cerca de 20 a 30 ovócitos desnudos com presença de CP e citoplasma homogêneo, foram submetidos aos mesmos procedimentos de ativação, e considerados como partenogeneticamente ativados (PA) e utilizados como grupo controle.

1.7 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após a MIV parte dos CCOs foram transferidos para gotas de 200µL de meio de fecundação, que consistia de meio Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP), suplementado com 0,5 mM/mL de penicilamina, 0,25 mM/mL de hipotaurina, 25mM de epinefrina e 10µg/ml de heparina. Sêmen congelado da mesma partida de um touro da raça Pantaneiro, previamente testado para o a produção *in vitro* de embriões, foi utilizado para todos os tratamentos e réplicas. Após o descongelamento, os espermatozoides foram selecionados pelo método de gradiente de Percoll (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA), utilizando 90% (400µl) e 45% (400µL) em microtubos de 1,5 mL, centrifugado por 5 minutos a 9000rpm ou 700g. O pellet obtido foi resuspendido e adicionado na gota de fecundação de forma a se obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides móveis /mL.

Os ovócitos foram co-incubados com os espermatozóides a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar, por um período de 18 horas. O dia da inseminação foi considerado como dia 0 (D0).

1.8 Cultivo *in vitro* de Embriões

Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de 200µL de meio SOFaaci, cobertas com óleo mineral, a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar, por sete dias.

Os zigotos oriundos da TNCS e partenogênese foram co-cultivados com monocamada de CC, previamente preparadas.

Para a preparação da monocamada, no dia da obtenção dos ovócitos imaturos, cerca de 10 a 15 CCOs foram desnudados em meio LAV, a solução resultante contendo as CCs foi centrifugada por 5 minutos a 200g. O pellet formado foi resuspendido em 200µL de SOFaaci e 7µL dessa solução contendo as CCs foi distribuída em cada gota de cultivo a ser utilizada no dia seguinte.

Em todos os experimentos os embriões foram avaliados quanto à clivagem em D2 e a formação de blastocistos em D7.

1.9 Avaliação da Cinética de Maturação Nuclear

Para avaliar o estágio da meiose nos diferentes momentos da maturação, os ovócitos foram retirados do cultivo, desnudados, fixados por 48 horas em etanol e ácido acético (3:1) e corados com lacmóide 45% em ácido acético glacial.

A avaliação dos estágios da meiose foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1,000X) e os ovócitos foram classificados em: vesícula germinativa (VG), vesícula germinativa rompida (GVBD); metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII). Foram considerados degenerados ou anormais os ovócitos que apresentavam a cromatina com alguma aberração, ou que não era possível identificar o estágio.

1.10 Contagem do Número Total de Células

No dia 7 (D7), os embriões foram incubados em uma solução de Hoechst 3342 (1mg/mL) diluída em PBS (phosphate-buffered saline) sem soro fetal bovino, a 38,5°C em 5% de CO₂ por 20 minutos. Em seguida, foram depositados em lâmina e cobertos com lamínula. O número de total de células foi determinado em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot, Germany R; filtro 24 com comprimento de onda de 330–365 nm excitação/emissão) (×100).

2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesse estudo foi avaliado se a retenção da meiose por um período de 6 horas antes da TNCS afeta o desenvolvimento embrionário posterior. Para isso foram realizados dois experimentos.

2.1 Experimento 1: Efeito da cilostamida durante a pré-maturação (PM) na produção de embriões por Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS)

A proposta nesse experimento foi testar um inibidor da fosfodiesterase 3A (PDE3A), a cilostamida, para a retenção da meiose dos ovócitos destinados à clonagem por TNCS. O objetivo de reter a meiose antes da maturação foi de melhorar a qualidade e utilizar uma maior quantidade de ovócitos viáveis, para serem micromanipulados por dia de manipulação e conseqüentemente, viabilizar a produção de maior número de embriões clone.

Para testar o uso da retenção foram utilizados dois grupos:

1. Controle (MIV): ovócitos maturados por 20 horas
2. Tratados (PM): ovócitos pré-maturados com 5mM de cilostamida por 6 horas e, posteriormente maturados por 20 horas.

Inicialmente, foi avaliada a eficiência do tratamento no bloqueio da meiose dos ovócitos tratados e, a capacidade desses de retomarem e completarem a maturação nuclear após o bloqueio. Para isso, foram coletadas amostras de CCOs no início (0 hora), no final da PM (6 horas) e, às 14 e 20 horas de maturação. Os ovócitos foram fixados, corados e avaliados quanto ao estágio da meiose.

Posteriormente foi testado se o bloqueio meiótico por 6 horas com cilostamida afetava a maturação citoplasmática dos ovócitos. Os CCOs dos dois grupos, após a maturação foram submetidos à FIV, e o desenvolvimento embrionário até o D7 de cultivo.

Finalmente, os ovócitos submetidos à PM por 6 horas foram utilizados para produzir embriões por TNCS. Para isso, os ovócitos dos dois grupos, maturados imediatamente após a seleção (grupo 1) e PM por 6 horas antes da maturação (grupo 2), foram submetidos a TNCS, ou a PA. Portanto, neste teste foram utilizados quatro grupos: TNCS controle, TNCS tratados, controle PA, e tratados PA. Após a ativação todos os grupos foram acompanhados quanto ao desenvolvimento embrionário até o D7 de cultivo.

2.2 Experimento 2: Efeito do Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) durante a pré-maturação (PM) na produção de embriões por Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS)

Este experimento foi semelhante ao experimento 1, apenas a substância utilizada para retenção da meiose foi substituída pelo NPPC, que é sintetizado pelas células da granulosa e induz a síntese de cGMP, que inibe atividade da PDE3A. Essa substituição foi realizada na tentativa de tornar o sistema de retenção o mais próximo possível do fisiológico. Da mesma forma que no experimento anterior, foram utilizados dois grupos:

1. Controle (MIV); ovócitos maturados por 20 horas.
2. Tratados (PM): ovócitos pré-maturados com 100 mM de NPPC por 6 horas e posteriormente maturados por 20 horas.

Para confirmar o bloqueio da meiose dos ovócitos tratados, CCOs foram coletadas no início (0 hora), no final da PM (6 horas) e às 14 e 20 horas de maturação. Posteriormente foi realizada a produção *in vitro* de embriões e, finalmente a TNCS ou PA, semelhante ao realizado no experimento 1.

3. Análise Estatística

Os dados de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$) e número total de células pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 Resultados

4.1 Experimento 1: Efeito da cilostamida durante a pré-maturação (PM) na produção de embriões por Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS)

Para determinar se o pré-tratamento dos CCOs com cilostamida promoveria a retenção da meiose, foi feita a avaliação da cinética de maturação nuclear. O grupo de ovócitos PM por 6 horas apresentou menor ($P < 0,05$) percentagem de ovócitos em VG do que o grupo 0 horas, entretanto essa taxa foi superior ($P < 0,05$) ao grupo maturados por 6 horas (Tabela 1). Apesar da diferença observada às 6 horas de cultivo entre o grupo PM e o controle (0 hora), ambos apresentavam a maioria dos ovócitos no estágio de VG. Às 20 horas de maturação a taxa de ovócitos que atingiram o estágio de MII foi superior no grupo PM em relação ao grupo MIV (Tabela 1).

Tabela 1. Estágios da meiose em ovócitos bovinos Pré-Maturados (PM) ou não (MIV) com 5µM de cilostamida às 0, 6, 14 e 20 horas de maturação *in vitro*.

Horas de cultivo Tratamento	N	Estágios de Maturação (%)			
		VG	VGBD	MI, AI, TI	M II
0 Horas	68	66 (97,1) ^a	2 (2,9) ^{b,c}	0 (0,0) ^d	0 (0) ^d
6 horas PM	65	57 (87,8) ^b	6 (9,2) ^b	2 (3,1) ^d	0 (0) ^d
6 horas MIV	52	37 (71,2) ^c	14 (26,9) ^a	1 (1,9) ^d	0 (0) ^d
6 PM+14MIV	52	1 (1,9) ^d	0 (0) ^c	36 (69,2) ^b	15 (28,8) ^c
14 horas MIV	60	0 (0) ^d	0 (0) ^c	60 (100) ^a	0 (0) ^d
6 PM+ 20 MIV	40	0 (0) ^d	0 (0) ^c	1 (2,5) ^d	39 (97,5) ^a
20 Horas MIV	55	0 (0) ^d	0 (0) ^c	8 (14,5) ^c	47 (85,5) ^b

^{a, b, c, d} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado (P<0,05). VG = vesícula germinativa; VGBD =vesícula germinativa rompida; MI = metáfase 1; AI = anáfase 1; TI = Telófase 1; MII = metáfase II.

Para avaliar o efeito da PM por 6 horas com cilostamida na maturação citoplasmática, ovócitos tratados e não tratados foram submetidos à FIV e, avaliados quanto à clivagem em D2 e quanto ao estágio embrionário em D7. Nenhuma diferença (P>0,05) entre os tratamentos foi observada na clivagem e na taxa de blastocisto (Tabela 2), mostrando não haver efeito do tratamento na capacidade dos ovócitos de se desenvolver até blastocisto.

Tabela 2. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 5µM cilostamida ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro*.

Tratamento	N	Nº Embriões (%)	
		Clivados D2	Blastocisto D7(%)
MIV	133	104 (78,2)	47 (35,5)
PM	147	113 (76,9)	43 (29,3)

Dados avaliados pelo teste chi-quadrado (P<0,05).

Quando o efeito da PM com cilostamida na produção de embriões clones foi avaliada, os grupos partenogeneticamente ativados (PA) foram utilizados como controle. A clivagem foi semelhante (P>0,05) para os ovócitos submetidos a PM dentro de cada grupo, TNCS e PA.

Entretanto, o grupo PA apresentou maior ($P<0,05$) taxa de clivagem do que o TNCS, independente dos ovócitos terem sido submetidos à PM. Já a taxa de blastocisto em D7 foi semelhante para os dois grupos de ovócitos (PM e MIV) submetidos à PA, porém uma menor ($P<0,05$) taxa de blastocisto foi observada no grupo TNCS quando ovócitos PM foram utilizados (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 5 μ M cilostamida ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto submetidos à transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ou ativação partenogênica (PA).

Tratamento	N	Nº Embriões (%)	
		Clivagem D2	Blastocisto D7
MIV-PA	115	103 (89,6) ^a	55 (47,8) ^a
PM- PA	94	81 (86,2) ^a	47 (50,0) ^a
MIV- TNCS	53	35 (66,0) ^b	16 (30,2) ^b
PM- TNCS	54	28 (51,9) ^b	4 (7,4) ^c

^{a, b, c, d} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado ($P<0,05$).

4.2 Experimento 2: Efeito do Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) durante a pré-maturação (PM) na produção de embriões por Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS)TNCS

Inicialmente foi avaliado se a utilização de PM com NPPC reteria o progresso da meiose. Semelhante ao experimento 1, às 0 horas de maturação no grupo PM, apesar de apresentar menor percentagem de ovócitos em VG do que o grupo MIV, mais de 80% dos ovócitos encontravam-se retidos nesse estágio (Tabela 4). Já o grupo maturado por 6 horas apresentou menor ($P<0,05$) percentagem de ovócitos em VG. Às 20 horas de maturação a taxa de ovócitos em MII foi semelhante ($P>0,05$) para os ovócitos submetidos a PM e os controle (Tabela 4). Entretanto, quando a avaliação foi realizada às 14 de maturação, cerca de 20% dos ovócitos do grupo PM já haviam completado a meiose, o que foi superior ($P<0,05$) aos 5% observado no grupo MIV.

Tabela 4. Estágios da meiose de ovócitos bovinos Pré-Maturados (PM) ou não (MIV) com 100 nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) às 0, 6, 14 e 20 horas de maturação *in vitro*.

Horas de cultivo Tratamento	Nº	Estágios de Maturação (%)			
		VG	VGBD	MI, AI, TI.	M II
0 horas	59	59 (100) ^a	0 (0) ^c	0(0,0) ^e	0 (0) ^c
6 horas PM	53	45 (84,9) ^b	4 (7,5) ^b	4(7,5) ^{c,d}	0 (0) ^c
6 horas MIV	50	24 (48) ^c	24 (48) ^a	2(4,0) ^{d,e}	0 (0) ^c
6 PM+14MIV	52	0 (0) ^d	0 (0) ^c	40(76,9) ^b	12 (23,1) ^b
14 horas MIV	61	0 (0) ^d	0 (0) ^c	58(95,1) ^a	3 (4,9) ^c
6 PM+ 20 MIV	51	0 (0) ^d	0 (0) ^c	8(15,7) ^c	43 (84,3) ^a
20 horas MIV	55	0 (0) ^d	0 (0) ^c	9(15,8) ^c	48 (84,2) ^a

^{a, b, c, d} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado (P<0,05). VG = vesícula germinativa; VGBD =vesícula germinativa rompida; MI = metáfase 1; AI = anáfase 1; TI = Telófase 1; MII = metáfase II.

Quando os ovócitos submetidos à PM com NPPC foram fecundados e cultivados *in vitro*, foi observado que o desenvolvimento embrionário foi semelhante (P>0,05) ao dos ovócitos controle (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 100 nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro*.

Tratamento	N	Nº Embriões (%)	
		Clivagem D2	Blastocisto D7
MIV	89	68 (76,4)	43 (48,3)
PM	90	70 (77,8)	41 (45,6)

Dados avaliados pelo teste chi-quadrado (P<0,05).

Os resultados do uso do NPPC na PM de ovócitos utilizados para a produção de embriões clones são apresentados na Tabela 6. A taxa de clivagem foi menor (P<0,05) no

grupo PA, produzido a partir de ovócitos retidos por 6 horas, do que nos demais grupos que não diferiram entre si ($P>0,05$). Entretanto, o uso de ovócitos PM com NPPC não afetou ($P>0,05$) a taxa de blastocisto dos embriões TNCS ou PA.

Tabela 6. Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 100 nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto submetidos à transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ou ativação partenogênica (PA).

Tratamento	N	Nº Embriões (%)	
		Clivagem D2	Blastocisto D7
MIV-PA	102	82 (80,4) ^a	47 (46,1) ^a
PM-PA	95	62 (65,3) ^b	40 (42,1) ^a
MIV- TNCS	79	54 (68,4) ^a	17 (21,5) ^b
PM- TNCS	78	54 (69,2) ^a	19 (24,4) ^b

^{a, b, c, d} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado ($P<0,05$).

Quanto ao número total de células dos embriões clone, não houve diferença entre os grupos PA ($P>0,05$) (Tabela 7). Também não houve diferença estatística entre os grupos TNCS ($P>0,05$).

Tabela 7. Número de células de embriões clones obtidos por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) ou ativação partenogênica (PA) produzidos à partir de ovócitos Pré-maturados (PM) com 100nM de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) por 6 horas ou não (MIV) em D7

Tratamento	Número embriões	Nº total de células (media±DP)
MIV-PA	18	116,33±28.7
PM-PA	20	114,15±27,5
MIV- TNCS	8	131,25±47,8
PM- TNCS	12	118,91±54,03

Dados avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

4.3 Discussão

Muitos dos problemas da clonagem ainda precisam ser solucionados antes que se tenha um aumento significativo na eficiência da técnica. A maioria deles incluem vários níveis de alterações epigenéticas, tais como a metilação de DNA e modificações pós-traducionais de histonas (Niemann *et al.*, 2008). Até que esses sejam resolvidos, a única forma de aumentar o número de produtos clonados, é aumentando o número de ovócitos micromanipulados e, auxiliar as células somáticas no processo de reprogramação. O ovócito tem um papel fundamental no resultado na TNCS, já que seu citoplasma deve conter todos os fatores de reprogramação para que possa apagar o padrão epigenético da célula doadora de núcleo. Além disso, o ovócito é o responsável pelo desenvolvimento embrionário, até que ocorra a transição materno-zigótica (Sirard, 2001). Portanto, pode-se esperar que quanto melhor a qualidade do ovócito, mais chance de se obter um melhor resultado na TNCS. Outro fator relacionado ao ovócito que deve ser levado em conta, é o tempo necessário para a micromanipulação e o curto período em que o ovócito permanece viável, sem que sofra os efeitos adversos do envelhecimento. Portanto, o número de ovócitos que podem ser micromanipulados é limitado, o que também afeta a quantidade de embriões produzidos.

Partindo do princípio que o tempo de manipulação é crucial para o sucesso da técnica de TNCS, e de que ovócitos devem estar sincronizados para enucleação e reconstrução, foi proposto nesse trabalho uma alternativa que permita manipular um número maior de ovócitos em um dia de manipulação, sem que haja prejuízo da qualidade do ovócito, através do bloqueio meiótico por um curto período.

Duas substâncias que comprovadamente bloqueiam a retomada espontânea da meiose por prevenir a queda intraovocitária de cAMP (Jee *et al.*, 2009; Guimaraes *et al.*, 2015a; Zhong *et al.*, 2015) foram utilizadas. No primeiro experimento, avaliamos a PM dos CCOs por 6 horas, utilizando a cilostamida. Apesar de haver diferença estatística entre os grupos 0 horas e 6 horas de PM, a maioria dos ovócitos tratados permaneceram em estado de vesícula germinativa (VG), comprovando o bloqueio meiótico. Esses resultados corroboram com os encontrados por diversos autores em diversas espécies (Luciano *et al.*, 2011a; Dieci, C. *et al.*, 2013; Buell *et al.*, 2015; Farghaly *et al.*, 2015) inclusive em bovinos (Mayes e Sirard, 2002; Albuz *et al.*, 2010b; Luciano *et al.*, 2011b; Ulloa *et al.*, 2014). O efeito da cilostaminada em reter a meiose, se deve a inibição da fosfodiesterase tipo 3A (PDE3A), que é específica do ovócito (Sasseville *et al.*, 2009b), e que é responsável por hidrolisar o cAMP. Portanto,

inibindo a atividade da PDE3A, os níveis de cAMP se mantêm altos e impedem que o ovócito retome a meiose.

Apesar da PM ter retido os ovócitos em VG de forma reversível, sendo que às 20 horas de MIV a percentagem de ovócitos em MII se assemelha ao controle, foi observado uma aceleração na cinética de maturação pós-bloqueio. Isso porque às 14 horas de MIV após a PM, cerca de 30% dos ovócitos já encontravam-se em estágio de MII, enquanto todos os ovócitos do grupo controle ainda não haviam completado a meiose. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores (Adona e Leal, 2004; Barretto *et al.*, 2011; Guimaraes *et al.*, 2015a), entretanto, a fisiologia e as implicações dessa aceleração ainda não foram completamente elucidadas.

Para assegurar que a PM com cilostamida não afetaria a maturação citoplasmática e capacidade de desenvolvimento embrionário, os ovócitos foram utilizados para PIVE, e apresentaram taxas de clivagem e blastocisto semelhantes às do grupo controle. Apesar de alguns estudos reportarem o efeito benéfico da retenção com cilostamida na produção de embriões (Gilchrist e Thompson, 2007; Vanhoutte *et al.*, 2008), nossos resultados mostraram que o cultivo de PM por 6 h não foi capaz de aumentar a competência para o desenvolvimento. Entretanto, nenhum efeito deletério foi observado, indicando que esse procedimento pode ser utilizado para manter por mais tempo a viabilidade de ovócitos bovinos. Resultados semelhantes foram encontrados por Jee e colaboradores (2009), que utilizando a PM em ovócitos de ratos, não detectaram aumento na competência ovocitária (Jee *et al.*, 2009). É possível que a diferença nos resultados possa ser devido aos tipos de ovócitos utilizados, já que de acordo com Luciano e colaboradores (2011), a retenção com cilostamida somente aumentou a produção de embriões quando ovócitos que ainda não atingiram seu crescimento total foram utilizados (Luciano *et al.*, 2011a).

Para avaliar o efeito da PM com cilostamida na competência para o desenvolvimento embrionário após a TNCS, foram utilizados como controles ovócitos ativados partenogeneticamente. A taxa de clivagem e blastocisto após a ativação partenogênica foi semelhante entre os grupos submetidos ou não a PM. Esses resultados confirmam os obtidos no teste anterior da PIVE, mostrando que esse procedimento não afetou o desenvolvimento embrionário.

Entretanto, os ovócitos PM mostraram uma redução drástica na taxa de blastocisto após a TNCS, não só em relação aos partenogênicos, mas também em relação ao controle TNCS. Esses resultados diferem dos obtidos por De Bem e colaboradores (2011), em que o desenvolvimento embrionário após a TNCS em bovinos foi similar entre ovócitos controle e

ovócitos submetidos à PM por 24 horas com Butirolactona I, um inibidor seletivo da atividade do Fator Promotor da Maturação (MPF) (De Bem *et al.*, 2011). Da mesma forma, o uso da PM por 24 horas com cilostamida em ovócitos suínos não afetou a produção de blastocisto após a TNCS (Dieci, C. *et al.*, 2013).

A diferença entre os resultados são difíceis de discutir considerando que existem poucos trabalhos na literatura utilizando esse tipo de procedimento. O motivo para a redução na produção de embriões observada neste estudo não está clara, mas, pode ter ocorrido uma interação entre o efeito deletério da micromanipulação e um possível efeito negativo da cilostamida. Essa hipótese foi baseada em estudos em nosso laboratório com a cilostamida, que mostraram que a concentração e o tempo de exposição afetam o desenvolvimento embrionário posterior dos ovócitos. Sendo que a melhor taxa de desenvolvimento embrionário foi observada na concentração de 10 μ M, por um período de PM de 8 horas (Guimaraes *et al.*, 2015a).

No presente estudo foi utilizada 5 μ M de cilostamida por 6 horas de PM, que não afetaria a taxa de embriões, entretanto quando os ovócitos foram expostos à micromanipulação, o efeito negativo da cilostamida pode ter sido exacerbado, resultando em uma menor taxa de produção de embriões. Este é o primeiro estudo que utiliza cilostamida para PM de ovócitos bovinos utilizados para TNCS.

No segundo experimento, foi proposto a utilização da PM de CCOs por 6 horas com o peptídeo natriurético do tipo C (NPPC). Semelhante ao observado com o uso da cilostamida, apesar da diferença estatística entre os grupos 0 horas e 6 horas de PM a maioria dos ovócitos se mantiveram no estágio de VG. Foi também constatada uma aceleração da meiose pós-retenção, não havendo diferença entre os tratamentos na taxa de ovócitos em MII às 20 horas de maturação. Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura (Franciosi *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015). O NPPC é um agente natural, produzido e liberado pelas células da granulosa mural, que se liga aos seus receptores NPR2 e NPR1 que estão associados à guanilil ciclase. Portanto, ao se ligar aos receptores o NPPC estimula a produção e liberação de cGMP que, através das GJs, passa das CCs para o ovócito e inibe a PDE3A, impedindo a degradação de cAMP interno e, bloqueando a retomada da meiose (Zhang *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Hiradate *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015).

Para avaliar se o a PM com NPPC afetaria na competência de desenvolvimento embrionário, os CCOs tratados foram submetidos à fecundação e cultivo por 7 dias. Os resultados encontrados corroboram com os encontrados por Franciosi e colaboradores (2014),

onde não houve diferença nas taxas de clivagem e produção de blastocisto, assegurando não haver efeito deletério do NPPC aos CCOs.

Quando ovócitos submetidos a PM com NPPC foram utilizados para a produção de embriões clone produzidos por TNCS, a taxa de clivagem e blastocisto foi semelhante ao grupo controle. Ou seja, a PM não afetou o resultado da TNCS. Apesar de não haver trabalhos utilizando o NPPC na produção de embriões clone, o resultado corrobora com os encontrados que utilizaram outros inibidores da retomada da meiose (De Bem *et al.*, 2011; Dieci, C. *et al.*, 2013). Com relação aos resultados do experimento anterior, é possível que o uso de uma menor concentração de cilostamida não tivesse efeito deletério quando associado com a TNCS, já que o uso dessa substância em suínos na concentração de 1 μM não afetou o resultado da TNCS. Entretanto, seria necessário testar se uma concentração menor de cilostamida seria suficiente para inibir a retomada da meiose em bovinos. Esse problema não foi observado com uso do NPPC, possivelmente pelo fato de ser uma substância naturalmente presente no organismo, o que não apresenta o risco de um efeito indesejado causado por fármacos (Franciosi *et al.*, 2014) mesmo quando associado ao estresse da micromanipulação. Portanto, o NPPC mostrou ser uma alternativa viável para usar a PM na TNCS.

Quanto à qualidade dos embriões produzidos avaliados pelo número total de células, nenhum efeito da PM ou da TNCS foi observado. Nossos resultados não mostraram efeito negativo na qualidade dos embriões produzidos por TNCS a partir de CCOs pré-maturados com NPPC, estando de acordo com trabalhos que produziram embriões clone com outros inibidores (De Bem *et al.*, 2011; Dieci, C. *et al.*, 2013) e PIVE (Franciosi *et al.*, 2014). Apesar de haver uma diferença com os resultados citados na literatura (De Bem *et al.*, 2011; Dieci, C. *et al.*, 2013), o que pode ser justificado pelo efeito da micromanipulação, o número total de células não se diferiu entre os grupos. A proposta de bloqueio da retomada espontânea da meiose tem como objetivo possibilitar a manipulação de uma maior quantidade de ovócitos em um mesmo dia. Na produção de embriões clones, o período de retenção pode ser estipulado de acordo com a rotina do laboratório, sendo possível programar as suas micromanipulações de modo a ter uma máxima eficiência produtiva.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados pode-se concluir que o uso da cilostamida retém a meiose, mas tem efeito deletério na produção de embriões clone. Já o NPPC na PM, foi eficaz em reter a meiose por 6 horas, sem afetar a qualidade e a produção de embriões clone. Desta forma o NPPC pode ser utilizado para a PM de ovócitos bovinos a serem utilizados na TNCS, possibilitando o uso de um número maior de ovócitos por dia de micromanipulação e, conseqüentemente o aumento na produção de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, n. 03, p. 197-204, 2004. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199404002771> >. Acesso em: 2004.

ADONA, P. R. et al. Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal reproduction science**, v. 104, n. 2-4, p. 389-97, Mar 3 2008a. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644285> >.

_____. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal reproduction science**, v. 108, n. 1-2, p. 49-65, Oct 2008b. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692479> >.

AKAGI, S. et al. Bovine nuclear transfer using fresh cumulus cell nuclei and in vivo- or in vitro-matured cytoplasts. **Cloning and stem cells**, v. 10, n. 1, p. 173-80, Mar 2008. ISSN 1536-2302 (Print)

1536-2302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18315502> >.

ALBUZ, F. K. et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, Dec 2010a. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870682> >.

_____. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Hum. Reprod.**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, Dec 2010b. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870682> >.

ARIAS, M. E.; ROSS, P. J.; FELMER, R. N. Culture medium composition affects the gene expression pattern and in vitro development potential of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. **Biological Research**, v. 46, p. 452-462, 2013. ISSN 0716-9760. Disponível em: < http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602013000400016&nrm=iso >.

ASHKENAZI, H. et al. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77-84, Jan 2005. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459120> >.

AUCLAIR, S. et al. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 6, p. E599-E613, 2013-03-15 00:00:00 2013. Disponível em: < <http://ajpendo.physiology.org/ajpendo/304/6/E599.full.pdf> >.

AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals**. 2nd ed. Cambridge University Press, 1982. ISBN 0521246288.

BARRETTO, L. S. S. et al. Meiotic inhibition of bovine oocytes in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on meiosis progression and developmental capacity. **Zygote**, v. 19, n. 02, p. 107-116, 2011. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S096719941000016X> >. Acesso em: 2011.

BEEBE, L. F. S.; MCILFATRICK, S. J.; NOTTLE, M. B. Cytochalasin B and Trichostatin A Treatment Postactivation Improves In Vitro Development of Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. **Cloning and stem cells**, v. 11, n. 4, p. 477-482, 2009/12/01 2009. ISSN 1536-2302. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/clo.2009.0029> >. Acesso em: 2016/01/17.

BLAHA, M.; NEMCOVA, L.; PROCHAZKA, R. Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit gonadotropin-induced activation of mitogen-activated protein kinase 3/1 in pig cumulus-oocyte complexes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://www.rbej.com/content/13/1/1> >.

BUELL, M.; CHITWOOD, J. L.; ROSS, P. J. cAMP modulation during sheep *in vitro* oocyte maturation delays progression of meiosis without affecting oocyte parthenogenetic developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 154, p. 16-24, 2015. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.012> >. Acesso em: 2016/01/04.

CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/RD08201> >.

CAMPBELL, K. et al. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Rev Reprod**, v. 1, n. 1, p. 40-46, January 1, 1996 1996. Disponível em: < <http://ror.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/1/1/40> >.

CAMPBELL, K. H. et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S214-31, Sep 1 2007. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17610946> >.

CAMPBELL, K. H. et al. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes.

Biology of reproduction, v. 50, n. 6, p. 1385-1393, June 1, 1994 1994. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/50/6/1385.abstract> >.

CAMPBELL, K. H. S. et al. Cloning: Eight Years After Dolly. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 256-268, 2005. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00591.x> >.

CHENG, W. T. et al. Enucleation after fusion and activation enhances the development of reconstructed bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 129, n. 3-4, p. 162-70, Dec 2011. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22225596> >.

CONTI, M. et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 715-23, Apr 2006. ISSN 0888-8809 (Print)

0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051667> >.

DAMIANI, P. et al. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 521-534, 1996. ISSN 1098-2795. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199612\)45:4<521::AID-MRD15>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<521::AID-MRD15>3.0.CO;2-Z) >.

DE BEM, T. H. et al. Viable calves produced by somatic cell nuclear transfer using meiotic-blocked oocytes. **Cellular reprogramming**, v. 13, n. 5, p. 419-29, Oct 2011. ISSN 2152-4998 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740268> >.

DE CESARO, M. P. et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal reproduction science**, v. 159, p. 52-9, Aug 2015. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26051611> >.

DIECI, C. et al. The Effect of Cilostamide on Gap Junction Communication Dynamics, Chromatin Remodeling, and Competence Acquisition in Pig Oocytes Following Parthenogenetic Activation and Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, 1-11, September 1, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/89/3/68.abstract> >.

DIECI, C. et al. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, Sep 2013. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926281> >.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal reproduction science**, v. 65, n. 3, p. 171-180, 2001. ISSN 0378-4320. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00207-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00207-4) >. Acesso em: 2016/01/17.

ENRIGHT, B. P. et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 3, p. 896-901, Sep 2003. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748129> >.

ENRIGHT, B. P. et al. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 4, p. 944-8, Apr 2005. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601924> >.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3, p. 203-216, 2003. ISSN 0378-4320.

FARGHALY, T. et al. The effect of temporary meiotic attenuation on the in vitro maturation outcome of bovine oocytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 51, n. 7, p. 662-671, 2015/08/01 2015. ISSN 1071-2690. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-015-9878-y> >.

FELMER, R.; ARIAS, M. E. Activation treatment of recipient oocytes affects the subsequent development and ploidy of bovine parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 6, p. 441-9, Jun 2015. ISSN 1098-2795 (Electronic)

1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940501> >.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023> >. Acesso em: 2015/12/20.

FRANCIOSI, F. et al. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 3, p. 61, Sep 2014. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078681> >.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, Jan 1 2007. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092551> >.

GÓMEZ, M. C. et al. Birth of African Wildcat Cloned Kittens Born from Domestic Cats. **Cloning and stem cells**, v. 6, n. 3, p. 247-258, 2004/09/01 2004. ISSN 1536-2302. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/clo.2004.6.247> >. Acesso em: 2015/12/15.

GREEN, A. L.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 3, p. 395-406, Sep 2007. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522076> >.

GUIMARAES, A. L. et al. The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Zygote**, p. 1-11, Apr 30 2015a. ISSN 1469-8730 (Electronic)

0967-1994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25925275> >.

_____. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52-7, Jan 1 2015b. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447152> >.

HIRADATE, Y. et al. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. **Zygote**, v. 22, n. 3, p. 372-7, Aug 2014. ISSN 1469-8730 (Electronic)

0967-1994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331536> >.

HOSSEINI, S. M. et al. Chemically assisted somatic cell nuclear transfer without micromanipulator in the goat: effects of demecolcine, cytochalasin-B, and MG-132 on the efficiency of a manual method of oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette. **Animal reproduction science**, v. 158, p. 11-18, 2015. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.002> >. Acesso em: 2016/01/19.

HWANG, S. et al. Improvement of Cloning Efficiency in Minipigs Using Post-thawed Donor Cells Treated with Roscovitine. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 212-216, 2013/11/01 2013. ISSN 1073-6085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-013-9671-7> >.

IWAMOTO, D. et al. Early development of cloned bovine embryos produced from oocytes enucleated by fluorescence metaphase II imaging using a conventional halogen-lamp microscope. **Cellular reprogramming**, v. 17, n. 2, p. 106-14, Apr 2015. ISSN 2152-4998 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826723> >.

JEE, B. C.; CHEN, H. Y.; CHIAN, R. C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 5 Suppl, p. 2037-42, May 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554590> >.

JEONG, Y. I. et al. Effects of Trichostatin A on In vitro Development of Porcine Embryos Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 26, n. 12, p. 1680-8, Dec 2013. ISSN 1011-2367 (Print)

1011-2367 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049758> >.

JESETA, M. et al. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 3, p. 469-75, Jun 2014. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24716726> >.

KATO, Y. Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2095-2098, 1998.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 2, p. 231-237, November 1, 2000 2000. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/120/2/231.abstract> >.

KEEFER, C. L. Artificial cloning of domestic animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 29, p. 8874-8, Jul 21 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195770> >.

KEEFER, C. L.; STICE, S. L.; MATTHEWS, D. L. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 4, p. 935-939, April 1, 1994 1994. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/50/4/935.abstract> >.

KIM, H. S. et al. Effects of Repetitive Ionomycin Treatment on *In Vitro* Development of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 132-139, 2012.

LAGUTINA, I. et al. Kinetics of Oocyte Maturation and Subsequent Development of IVF, Parthenogenetic, and NT Bovine Embryos after Meiotic Inhibition with Roscovitine. **Cloning and stem cells**, v. 4, n. 2, p. 113-119, 2002/06/01 2002. ISSN 1536-2302. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/153623002320253292> >. Acesso em: 2016/01/02.

LEE, M.-J. et al. Trichostatin A Promotes the Development of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 1, p. 34-42, 2011.

LEE, S. et al. Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p. 145-54, Jul 1 2015. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819224> >.

LÉVESQUE, J.; SIRARD, M. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 34, n. 2, p. 133-139, 1994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:19940204> >.

LIU, J. et al. Production of cloned embryos from caprine mammary epithelial cells expressing recombinant human beta-defensin-3. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 660-6, Mar 1 2013. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267731> >.

LIU, Y. et al. Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. **Microscopy research and technique**, v. 69, n. 10, p. 799-807, Oct 2006. ISSN 1059-910X (Print)

1059-910X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886230> >.

LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 915-24, May 2008. ISSN 1098-2795 (Electronic)

1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948251> >.

LU, F. et al. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1309-19, Oct 1 2005. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139607> >.

LUCIANO, A. M. et al. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252-9, Dec 2011a. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816847> >.

_____. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biol. Reprod.**, v. 85, n. 6, p. 1252-9, Dec 2011b. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816847> >.

MAJERUS, V. et al. Characterization of embryos derived from calf oocytes: Kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 346-352, 2000. ISSN 1098-2795. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2795\(200012\)57:4<346::AID-MRD6>3.0.CO;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2795(200012)57:4<346::AID-MRD6>3.0.CO;2-M) >.

MARQUES, M. G. et al. Effect of culture media on porcine embryos produced by in vitro fertilization or parthenogenetic activation after oocyte maturation with cycloheximide. **Zygote**, v. 19, n. 4, p. 331-7, Nov 2011. ISSN 1469-8730 (Electronic)

0967-1994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232168> >.

MAYES, M. A.; SIRARD, M.-A. Effect of Type 3 and Type 4 Phosphodiesterase Inhibitors on the Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest. **Biol. Reprod.**, v. 66, n. 1, p. 180-184, January 1, 2002. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/66/1/180.abstract> >.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP Kinase Activities in Bovine Oocytes following Protein Synthesis Inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3-4, p. 183-188, 2001. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00283.x> >.

MOURA, M. T. et al. Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. **Animal reproduction science**, v. 109, n. 1, p. 40-49, 2008. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.013> >. Acesso em: 2016/01/21.

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 5, p. 2-10, Aug 2012. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913555> >.

NIEMANN, H. et al. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 151-63, Feb 2008. ISSN 1470-1626 (Print)

1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239046> >.

OGURA, A.; INOUE, K.; WAKAYAMA, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1609, p. 20110329, Jan 5 2013. ISSN 1471-2970 (Electronic)

0962-8436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166393> >.

OHKOSHI, K. et al. Caprine somatic cell nuclear transfer using in vivo matured oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Animal Science Journal**, v. 74, n. 4, p. 269-276, 2003. ISSN 1740-0929. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1344-3941.2003.00116.x> >.

OROPEZA, A. et al. Improvement of the Developmental Capacity of Oocytes from Prepubertal Cattle by Intraovarian Insulin-Like Growth Factor-I Application. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1634-1643, June 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/70/6/1634.abstract> >.

PARK, J.-Y. et al. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-684, January 30, 2004 2004. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/303/5658/682.abstract> >.

REGGIO, B. C. et al. Cloned Transgenic Offspring Resulting from Somatic Cell Nuclear Transfer in the Goat: Oocytes Derived from Both Follicle-Stimulating Hormone-Stimulated and Nonstimulated Abattoir-Derived Ovaries. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1528-1533, November 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/65/5/1528.abstract> >.

RENNER, S. et al. Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1505-11, May 2013. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274907> >.

SAADELDIN, I. M. et al. Improvement of Cloned Embryos Development by Co-Culturing with Parthenotes: A Possible Role of Exosomes/Microvesicles for Embryos Paracrine Communication. **Cellular reprogramming**, 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801USA, v. 16, n. 3, p. 223-234, 2014. ISSN 2152-4971

2152-4998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030698/> >.

SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 2, p. 415-25, Aug 2009a. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357367> >.

_____. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biol. Reprod.**, v. 81, n. 2, p. 415-25, Aug 2009b. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357367> >.

SCHURMANN, A.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring. **Reproduction**, v. 132, n. 6, p. 839-48, Dec 2006. ISSN 1470-1626 (Print)

1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127744> >.

SHI, D. et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 2, p. 285-91, Aug 2007. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475931> >.

SHIN, T. et al. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 859, Feb 21 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859353> >.

SHU, Y. M. et al. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human reproduction**, v. 23, n. 3, p. 504-13, Mar 2008. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216034> >.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-1254, 2001. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01004800> >.

SONG, Z. et al. Establishment, Differentiation, Electroporation and Nuclear Transfer of Porcine Mesenchymal Stem Cells. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 50, n. 5, p. 840-8, Oct 2015. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331974> >.

SU, J. et al. Recombinant human growth differentiation factor-9 improves oocyte reprogramming competence and subsequent development of bovine cloned embryos. **Cellular reprogramming**, v. 16, n. 4, p. 281-9, Aug 2014. ISSN 2152-4998 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840335> >.

SU, J. et al. Oocyte-secreted factors in oocyte maturation media enhance subsequent development of bovine cloned embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 4, p. 341-9, Apr 2014. ISSN 1098-2795 (Electronic)

1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24420374> >.

TAN, J. H. et al. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 1, p. 1-9, Jan 2009. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019837> >.

TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Direct Exposure of Chromosomes to Nonactivated Ovum Cytoplasm Is Effective for Bovine Somatic Cell Nucleus Reprogramming. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 1, p. 324-330, January 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/64/1/324.abstract> >.

TECIRLIOGLU, R. T. C., M. A.; LEWIS, I. M.; KORFIATIS, N. A.; HODGSON, R.; RUDDOCK, N. T.; VAJTA, G.; DOWNIE, S.; TROUNSON, A. O.; HOLLAND, M. K.; FRENCH, A. J. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, n. 5, p. 573-585, 2005. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/RD04122> >.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592-600, Jun 2010. ISSN 1097-4652 (Electronic)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20232297> >.

TSAFRIRI, A. et al. Oocyte Maturation Involves Compartmentalization and Opposing Changes of cAMP Levels in Follicular Somatic and Germ Cells: Studies Using Selective Phosphodiesterase Inhibitors. **Developmental Biology**, v. 178, n. 2, p. 393-402, 1996. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160696902262> >.

ULLOA, S. M. et al. Effects of different oocyte retrieval and in vitro maturation systems on bovine embryo development and quality. **Zygote**, p. 1-11, Jan 15 2014. ISSN 1469-8730 (Electronic)

0967-1994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423448> >.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. **Animal reproduction science**, v. 92, n. 3-4, p. 211-30, May 2006. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406426> >.

VAJTA, G. et al. Somatic Cell Cloning without Micromanipulators. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 89-95, 2001/06/01 2001. ISSN 1520-4553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/15204550152475590> >. Acesso em: 2016/01/19.

VANHOUTTE, L. et al. Assessment of a new in vitro maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human reproduction**, v. 24, n. 8, p. 1946-59, Aug 2009. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19395363> >.

VANHOUTTE, L. et al. Effect of temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor on morphological and functional aspects of in vitro matured mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 6, p. 1021-30, Jun 2008. ISSN 1098-2795 (Electronic)

1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163445> >.

VERMA, G. et al. Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, p. 43, 2015. ISSN 1674-9782 (Print)

1674-9782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473031> >.

WELLS, D. Nuclear transfer: the importance of donor and recipient cells for nuclear reprogramming and cloning efficiency in mammals. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl 2, p. 487-507, 2010. ISSN 1679-9216. Disponível em: < http://www.ufrgs.br/actavet/38-suple-2/09_SBTE_DWELLS.pdf >.

WHITWORTH, K. M. et al. Transcriptome Analysis of Pig In Vivo, In Vitro-Fertilized, and Nuclear Transfer Blastocyst-Stage Embryos Treated with Histone Deacetylase Inhibitors Postfusion and Activation Reveals Changes in the Lysosomal Pathway. **Cellular reprogramming**, v. 17, n. 4, p. 243-58, Aug 2015. ISSN 2152-4998 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26731590> >.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Cloning and stem cells**, v. 9, n. 1, p. 3-7, Spring 2007. ISSN 1536-2302 (Print)

1536-2302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386005> >.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/385810a0> >.

ZHANG, M. et al. Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 366-369, October 15, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/330/6002/366.abstract> >.

ZHONG, Y. et al. C-Type natriuretic peptide maintains domestic cat oocytes in meiotic arrest. **Reproduction, fertility, and development**, Apr 15 2015. ISSN 1031-3613 (Electronic)

1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25873238> >.