

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

STEPHANIE MAYRA PACÍFICO DE SOUZA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS: *Efeito da agregação de células-tronco adultas oriundas do tecido adiposo em embriões tetraploides.*

**Campos dos Goytacazes
2013**

STEPHANIE MAYRA PACÍFICO DE SOUZA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS: *Efeito da agregação de células-tronco adultas oriundas do tecido adiposo em embriões tetraploides.*

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes

**Campos dos Goytacazes
2013**

STEPHANIE MAYRA PACÍFICO DE SOUZA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS: *Efeito da agregação de células-tronco adultas oriundas do tecido adiposo em embriões tetraploides.*

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 19 de Dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes (Orientador)

Dra. Raquel Varella Serapião (Pesquisadora PESAGRO – RJ)

Profa. Dra. Célia Raquel Quirino (UENF - RJ)

Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias (UENF – RJ)

Aos meus pais, às minhas irmãs e ao meu nAMORado,
com todo o carinho, dedico. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a força maior que rege todo o universo;

Ao meu orientador, Professor Dr. Reginaldo Fontes, por confiar a mim desafios científicos, pelo apoio e confiança ao longo do mestrado;

À Professora Dra. Célia Raquel Quirino, profissional ética e dedicada, “mãezona” de seus orientados e agregados. Muito obrigada pela oportunidade e confiança;

Ao Professor Dr. Ângelo Burla Dias, pela paciência e disponibilidade;

As amigas e técnicas do LRMGA, Carla Sobrinho Paes de Carvalho e Bruna Lomba Dias. Sem o apoio de vocês nada disto seria possível;

Aos amigos e funcionários do “Curral”, principalmente à Margareth e Vidal. Obrigada por tornarem os meus dias mais felizes;

Aos amigos do LRMGA, Alinne, Aline, Janaína, Laura, Laurinha, Natália, Diego, Gester, Valter, Wilder, Gleice, Júlia, Mariana, Júnior que direta ou indiretamente colaboraram para este trabalho;

A minha grande amiga Julie. Obrigada pelo apoio, paciência e disponibilidade em ajudar. Sem você os dias seriam mais difíceis;

À Mariane, secretária do LRMGA e Jovana, secretária da pós-graduação, sempre dispostas a ajudarem no que for preciso sem medir nenhum esforço;

À UENF, pelo apoio financeiro e por me acolher tão bem.

MUITO OBRIGADA!

“Se a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela.”
(Albert Einstein)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”
(George Bernard Shaw)

RESUMO

Em decorrência das perdas peri-implantacionais em proporções estimadas em 50%, associados com deficiências funcionais que ocorrem no início da placentação em bovinos produzidos por Transferência Nuclear, surgiu o conceito de Complementação Embrionária, tecnologia em que se têm células tetraploide/diploide (4n/2n). O objetivo do presente estudo foi produzir blastocistos a partir da agregação de células-tronco provenientes do tecido adiposo em embriões bovinos tetraploides. Os oócitos foram obtidos de ovários de abatedouro, selecionados, transferidos para meio de TCM 199 e maturados por um período de 22-24 horas. Realizou-se a fertilização *in vitro* (FIV) com sêmen de um único touro. O meio de cultivo *in vitro* (CIV) utilizado foi o "synthetic oviduct fluid". Durante todo o cultivo os embriões foram mantidos em estufa com controle de temperatura e atmosfera. De 30-35 horas após a fertilização, os embriões com 2 blastômeros foram selecionados e inseridos em meio com polietilenoglicol (PEG). O tecido adiposo foi degradado enzimaticamente pela colagenase, centrifugado e cultivado até a 4ª passagem. Embriões 4n pré-compactados foram agregados com células 2n. Os dados foram analisados por Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey e t de Student (cariotipagem). Após a degradação enzimática do tecido adiposo, obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico e com formato fibroblástico, o que validaria o protocolo utilizado neste trabalho, tendo em vista a celularidade e morfologia. Após a fusão com PEG, 91,5% dos embriões se fundiram, 72,8% clivaram, 30,5% chegaram a blastocisto e 11,8% eclodiram; não apresentando diferença estatística com os demais grupos. Na análise da cariotipagem obteve-se 21,21% de 4n verdadeiros. Do total de 76 embriões que passaram pela agregação, obtivemos uma taxa de 59,2% de agregados. Além disso, vale destacar que as taxas de produção de mórulas e blastocistos se diferenciaram ($P < 0,05$) entre os grupos estudados. Pode-se dizer que os embriões 2n + 4n produzidos pela agregação desenvolveu-se até estruturas semelhantes a blastocistos, entretanto estudos posteriores são necessários a fim de confirmar a composição genotípica e fenotípica de animais nascidos.

Palavras-chave: Bovinos, Células-tronco, Tetraploide, Agregação.

ABSTRACT

A result of the pre-implantation losses estimated at 50% proportions, with associated functional deficits that occur at the beginning of placentation in cattle produced by nuclear transfer, the concept of complementation embryonic technology that have cells tetraploid/diploid (4n/2n). The aim of this study was to produce blastocyst from the aggregation of stem cells from adipose tissue in bovine tetraploid embryos. The oocytes were obtained from slaughterhouse ovaries, selected, transferred to a medium TCM 199 and matured for a period of 22-24 hours. Took place in vitro fertilization (IVF) with semen from a single bull. The medium in vitro culture (IVC) was used "synthetic oviduct fluid". During all the culture embryos were maintained in a greenhouse with control temperature and atmosphere. Than 30-35 hours after fertilization, the embryos with two blastomeres were selected and inserted in media with polyethylene glycol (PEG). Adipose tissue was enzymatically degraded by collagenase, centrifuged and cultured until the 4th passage. 4n pre-compacted embryos were aggregated with 2n cells. The data were tested by Analysis of Variance and means were compared by Tukey and Student t test (karyotyping). After the enzymatic degradation of adipose tissue was obtained from a culture monolayer adherent to plastic and fibroblast format, which validates the protocol we used, in order to tend cellularity and morphology. After fusion with PEG, 91.5% of the embryos fused, 72.8% cleaved, 30.5% arrived the blastocyst and 11.8% broke out, with no statistical difference with the other groups. In the analysis of the karyotype was obtained 21.21% of true 4n. From the total of 76 embryos who passed through the aggregation, we obtained a rate of 59.2% of aggregates. Furthermore, it is noteworthy that the rates of production of morulas and blastocysts differed statistically ($P < 0.05$) between groups. You could say that the 2n + 4n embryos produced by aggregation developed into blastocysts similar to structures, however further studies are needed to confirm the genotypic and phenotypic composition of animals which were born.

Keywords: Stem cells, Tetraploid, Aggregation, Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Agregação de embriões tetraploides.....	23
Figura 2: Técnicas de complementação embrionária.....	29
Figura 3: Bezerros derivados da agregação de células-tronco embrionárias com embriões tetraploides.....	30
Figura 4: Células-tronco.....	32
Figura 5: Representação de diferentes possibilidades de transdiferenciação das células-tronco adultas (CTA), demonstrando haver grande plasticidade celular.....	34
Figura 6: Microtubos para centrifuga utilizados para realizar a agregação do embrião tetraploide com as células-tronco diploides.....	44
Figura 7: Células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo bovino em distintas passagens.....	47
Figura 8: Embriões bovinos.....	48
Figura 9: Blastocistos bovinos.....	49
Figura 10: Cariotipagem dos embriões bovinos.....	51
Figura 11: Blastocistos formados pela agregação de embriões bovinos tetraploides e células-tronco provenientes do tecido adiposo.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da fusão e do desenvolvimento embrionário.....	50
Tabela 2: Cariotipagem embrionária.....	51
Tabela 3: Dados comparativos de desenvolvimento embrionário.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma (s)
µl	Microlitro (s)
µs	Microsssegundo (s)
2n	Diploide
4n	Tetraploide
Agr	Agregação
Be	Blastocisto (s) Eclodido (s)
Bl	Blastocisto (s)
BME	Solução de Aminoácidos
BSA	Albumina Sérica Bovina
CB	Citocalasina B
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
CD	Citocalasina D
Cl	Clivagem
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
cm.	Centímetro (s)
cm ²	Centímetro (s) Quadrado (s)
CO ₂	Gás Carbônico
COC's	Complexo <i>Cumulus</i> -oócitos
CP	Corpúsculo Polar
CT	Células-tronco
CTA	Células-tronco Adultas
CTAD	Células-tronco Derivadas do Tecido Adiposo
CTE	Células-tronco Embrionárias
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
D0	Dia 0

D4	Dia 4
D6	Dia 6
D7	Dia 7
D8	Dia 8
D9	Dia 9
DMSO	Dimetilsulfóxido
eGFP	Proteína Fluorescente Verde
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
Fs	Fusão
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Grama (s)
hpf	Horas Após a Fertilização
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IPS	Do Inglês “Induced Pluripotency Stem Cells”
Kv	Quilovolts
LH	Hormônio Luteinizante
LRMGA	Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal
MCI	Massa Celular Interna
MEM	Solução de Aminoácidos Não Essenciais
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
MO	Medula Óssea
Mo	Mórula (s)
n	Número de Estruturas
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
PBSA	Solução de Tampão Fosfato sem Cálcio e Magnésio

PEG	Polietilenoglicol
PF	Punção Folicular
PHE	Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
rpm	Rotações Por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Do Inglês “Synthetic Oviduct Fluid”
TE	Transferência de Embriões
TN	Transferência Nuclear
Tx	Taxa
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UI	Unidades Internacionais
USP	Universidade de São Paulo
x	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	16
2	HIPÓTESE EXPERIMENTAL	19
3	OBJETIVOS -----	20
3.1	OBJETIVO GERAL-----	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	20
4	REVISÃO DE LITERATURA -----	21
4.1	TRANSFERÊNCIA NUCLEAR E A PRODUÇÃO DE INDIVÍDUOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS-----	21
4.2	O EMBRIÃO TETRAPLOIDE-----	23
4.2.1	Métodos de produção de embriões tetraploides -----	23
4.2.1.1	Inibição da expulsão do corpúsculo polar-----	24
4.2.1.2	Eletrofusão-----	24
4.2.1.3	Inibição da clivagem-----	25
4.2.1.4	Fusão de blastômeros-----	26
4.2.2	Complementação do embrião tetraploide -----	26
4.3	CÉLULAS-TRONCO-----	30
4.3.1	Células-tronco adultas -----	32
4.3.1.1	Células-tronco mesenquimais-----	33
4.3.1.2	Plasticidade das células-tronco adultas-----	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL-----	36
5.2	LOCAL DO EXPERIMENTO-----	37
5.3	FONTES DE OÓCITOS-----	37
5.4	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS -----	37
5.5	PREPARO DO SÊMEN E FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS-----	38
5.6	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	39
5.7	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES TETRAPLOIDES-----	39
5.8	CARIOTIPAGEM EMBRIONÁRIA.....	40
5.9	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSEO BOVINO-----	40
5.9.1	Coleta do tecido adiposo	40

5.9.2	Isolamento, cultivo e expansão das células-tronco mesenquimais..	41
5.9.3	Criopreservação das células-tronco mesenquimais.....	42
5.9.4	Descongelamento e cultivo celular.....	43
5.10	COMPLEMENTAÇÃO EMBRIONÁRIA PELA AGREGAÇÃO CELULAR	43
5.11	ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO-----	44
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1	CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO BOVINO.....	46
6.2	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES TETRAPLOIDES.....	47
6.3	AGREGAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	51
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	56
	ANEXO -----	69

1 INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Nesse sentido, especialmente no tocante a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a punção folicular (PF), a produção *in vitro* (PIV) e a transferência de embriões (TE) vem sendo utilizadas com sucesso a nível comercial (FIGUEIREDO et al., 2007). Entretanto, além dessas, existem outras biotécnicas como a transferência nuclear (TN) e a transgênese que ainda estão em desenvolvimento.

Apesar da extensa utilização e da ampla aplicação em animais, algumas biotécnicas da reprodução apresentam efeitos, como baixa eficiência, elevada incidência de distúrbios do crescimento e do desenvolvimento e alta mortalidade embrionária, fetal e péri-natal (PORCIUNCULA, 2007). Contudo é descrito que uma taxa significativa da mortalidade de embriões produzidos *in vitro* ocorre por defeitos na placentação (FARIN et al., 2006), o que também é observado em animais oriundos da tecnologia de clonagem por TN (LACERDA, 2006).

Após os primeiros relatos de nascimentos de bovinos geneticamente idênticos produzidos por TN, vários estudos têm sido realizados para esclarecer as falhas desta biotecnologia e aprimorar sua eficiência. Menos de 10% dos embriões produzidos por esta técnica que são transferidos para vacas receptoras são capazes de produzir um animal saudável (CIBELLI, 2007) e somente entre 0 e 4% destes embriões viáveis são capazes de atingir a idade adulta (GURDON e MELTON, 2008).

Estudos mais aprofundados sobre as metodologias de produção de indivíduos geneticamente idênticos são necessários, visto que, a produção animal utilizando as biotécnicas de clonagem podem ser empregadas em diferentes setores de investigação básica e aplicada. Essas técnicas podem ser utilizadas para conhecer as interações entre o núcleo e o citoplasma durante a reprogramação celular (GAO et al., 2007), contribuindo para o progresso na área de biologia do desenvolvimento. Além disso, a clonagem pode produzir rebanhos em larga escala com características geneticamente importantes para a produção e reprodução (BHOJWANI et al., 2005),

bem como para a conservação e recuperação de recursos genéticos (FOLCH et al., 2009). Outra aplicabilidade e, talvez a mais interessante e promissora, é a utilização de clones na produção e multiplicação de animais transgênicos produtores de proteínas recombinantes que auxiliariam em novas alternativas de tratamento em humanos (BAGUISI et al., 1999).

Com isso, a complementação embrionária vem como uma estratégia de produção de animais geneticamente idênticos, visto que o embrião é composto por ploidias distintas: os anexos embrionários são tetraploides ($4n$) e o embrião em si é diploide ($2n$). Células $4n$ não seguem um padrão aleatório de distribuição no conceito, contribuindo quase que exclusivamente na formação de elementos extraembrionários, devido à necessidade de euploidia para o correto funcionamento das células somáticas e do tecido como um todo (EVERETT e WEST, 1998). Característica que tende a elevar a eficiência na produção de clones.

Vale ressaltar que a técnica de complementação embrionária, tanto por microinjeção quanto por agregação, se encontra bem desenvolvida em camundongos, uma vez que, há o nascimento de animais de várias linhagens (KANG et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2009), inclusive com fertilidade comprovada (LEE et al., 2007; LI et al., 2007). Diferentemente do que ocorre em camundongos, a complementação embrionária não está bem estabelecida em bovinos, visto que, somente Berg (1982), James e West (1994) e Iwasaki et al. (2000) relataram o nascimento de bezerros oriundos da agregação de embrião $4n$ com células da MCI de um embrião $2n$.

Somado a isso, a descoberta das células-tronco embrionárias e de sua capacidade pluripotente, possibilitou o surgimento de novas perspectivas para o uso das mesmas, inclusive como fonte de células $2n$. No entanto, existem algumas questões que impedem sua utilização na pesquisa ou terapia celular, e, portanto surgiu a necessidade da descoberta de fontes celulares alternativas que possuem características semelhantes.

Desta forma, a utilização de células-tronco adultas surgiu como uma alternativa promissora devido ao seu potencial de renovação e na sua capacidade de originar células com funções específicas (KRAUSE, 2002). Já foram descritas diversas fontes para a sua obtenção, sendo as principais: medula óssea, cordão umbilical, líquido amniótico, sangue periférico e tecido adiposo.

Portanto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de produzir blastocistos a partir da agregação de células-tronco provenientes de tecido adiposo em embriões bovinos tetraploides.

2 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A agregação de embriões tetraploides com células-tronco adultas provenientes de tecido adiposo bovino é capaz de gerar blastocistos com componente tetraploide nas células do trofoblasto e diploide nas células da massa celular interna.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produção de blastocistos a partir da agregação de células-tronco de tecido adiposo com embriões bovinos tetraploides.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Produzir embriões bovinos tetraploides *in vitro* pelo uso do polietilenoglicol como indutor da fusão dos blastômeros e avaliar seu desenvolvimento;
- 2) Estabelecer um protocolo viável de produção de células-tronco adultas obtidas à partir de tecido adiposo bovino;
- 3) Avaliar o desenvolvimento embrionário obtido pela agregação dos embriões tetraploides com as células-tronco adultas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 TRANSFERÊNCIA NUCLEAR E A PRODUÇÃO DE INDIVÍDUOS GENETICAMENTE IDÊNTICOS

Durante várias décadas, diferentes grupos de pesquisa, buscando conhecer os aspectos fisiológicos e embrionários envolvidos na reprodução, bem como obter descendentes de animais geneticamente valiosos, estudaram a utilização de um conjunto de técnicas como ferramentas para a realização de tais objetivos. Seguindo esta temática, biotécnicas de última geração foram desenvolvidas, em especial, a clonagem por TN (PEREIRA, 2010).

A técnica de clonagem empregando células diferenciadas adultas foi realizada com sucesso, pela primeira vez, em ovinos (WILMUT et al., 1997). Neste experimento, após a reconstrução de embriões com células da glândula mamária, obteve-se o nascimento da ovelha Dolly. Este acontecimento foi um marco da reprodução, pela primeira vez, de que era possível clonar um mamífero a partir de uma célula somática diferenciada. Após publicação de Wilmut et al. (1997), o sucesso da clonagem com células diferenciadas foi também alcançado em bovinos, murinos, caprinos, suínos, felinos e equídeos (BAGUISI et al., 1999; KATO et al., 1998; ONISHI et al., 2000; SHIN et al., 2002; WAKAYAMA et al., 1998; WOODS et al., 2003).

De acordo com Visintin (2008), no Brasil no ano de 2001 nasceu o primeiro clone a partir de célula embrionária, recebendo o nome de vitória. No ano de 2002, no estado de São Paulo nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada jovem, o bezerro Marcolino da Universidade de São Paulo (USP), o qual apresentou desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais. No mesmo ano (2002), em Jaboticabal, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada adulta, a bezerra Penta. E em Dezembro de 2003, nasceu a Bela da USP, uma bezerra Nelore oriunda de célula diferenciada adulta, apresentando desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais (MELLO, 2003).

De acordo com, Bordignon, 2008 citado por Trecenti, 2013. A clonagem por transferência nuclear se baseia na substituição da cromatina de um óvulo maturado,

ou seja, no estágio que ele estaria apto a ser fecundado, pelo núcleo de uma célula retirada do animal a ser clonado. Por outro lado, o tema clonagem segue gerando efusivos debates e controvérsias, no entanto mediante a possibilidade dessa tecnologia vir a ser testada em seres humanos. Apesar disso o uso da TN gerou novos conhecimentos e oferece oportunidades comerciais bastante promissoras, como a utilização na preservação de espécies em vias de extinção, na criação de animais transgênicos, na propagação de animais de alto valor zootécnico e na geração de células ou tecidos para fins terapêuticos, de acordo com Bordignon, 2003.

A produção de bovinos a partir da técnica de TN utilizando células somáticas diferenciadas possibilita a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos em larga escala e também bovinos transgênicos (geneticamente modificados). No entanto, as taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões clonados a partir de células diferenciadas permanecem baixas. Este insucesso deve-se, principalmente, a baixa taxa de implantação, pelos frequentes problemas placentários e pela alta mortalidade embrionária, fetal e perinatal. Essas dificuldades, segundo Bordignon (2003), ocorrem porque núcleos de células diferenciadas não são corretamente reconduzidos ao estágio embrionário nos embriões clonados (reprogramação nuclear), levando a expressão errônea de genes que são necessários para sustentar o desenvolvimento normal. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reprogramação nuclear representa um dos principais desafios para aumentar a eficiência da clonagem, visto que hoje a técnica vem sendo aplicada inclusive comercialmente.

4.2 O EMBRIÃO TETRAPLOIDE

Embriões $4n$ têm sido utilizados na reprodução de animais, principalmente camundongos. Nos embriões $4n/2n$ há uma distribuição não aleatória das células durante o desenvolvimento do conceito. Nesse tipo de embriões, o componente $4n$ contribui para a formação de tecidos extra-embriônicos, enquanto que a MCI é formada apenas por células embrionárias $2n$ (JAMES et al., 1995; EVERETT e WEST, 1998; SEMBON et al., 2011) (Figura 1).

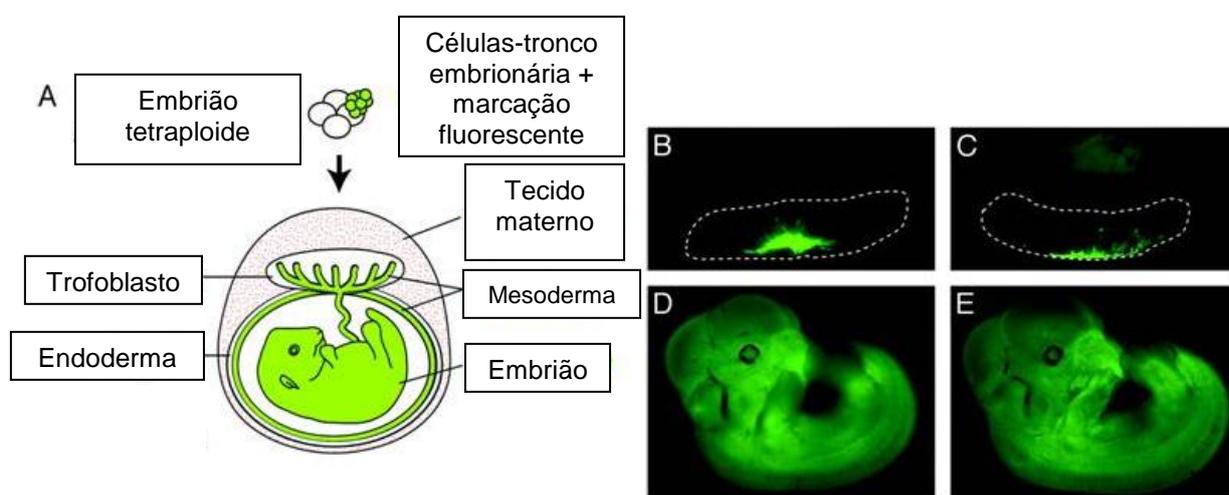


Figura 1: Agregação de embrião tetraploide.
Fonte: HIRASHIMA et al., 2003.

4.2.1 Métodos de produção de embriões tetraploides

Embriões $4n$ podem resultar da inibição da clivagem numa fase inicial de desenvolvimento embrionário (SNOW, 1973), fusão de blastômeros (EGLITIS, 1980; SPINDLE, 1981; O'NEILL et al., 1990) ou eletrofusão (CURNOW et al., 2000; IWASAKI et al., 2000; DARABI et al., 2008; RAZZA, 2011) em camundongos, coelhos, suínos e bovinos. Além disso, oócitos $2n$ podem ser formados pela inibição da expulsão do CP (corpúsculo polar), originando assim embriões $4n$ partenogênicos (BAI et al., 2011).

4.2.1.1 Inibição da expulsão do corpúsculo polar

A interrupção ou inibição da montagem de microfilamentos pela Citocalasina B (CB) ou Citocalasina D (CD) durante a meiose não impede a quebra da vesícula germinativa do oócito, mas resulta na inibição da extrusão do CP no camundongo (WASSARMAN et al., 1976; KUBIAK et al., 1991; ZHU et al., 2003) e porco (SOMFAI et al., 2006). Quando oócitos de camundongos foram expostos à CD, ocorreu segregação de cromossomos homólogos, resultando em dois fusos meióticos que fundiram em um único eixo (KUBIAK et al., 1991). Em suínos, a CB causa efeitos semelhantes aos verificados na segregação dos cromossomos homólogos de camundongos (SOMFAI et al., 2006). Um fenômeno similar foi observado com oócitos bovinos tratados com nicotina, resultando na ocorrência de oócitos $2n$ (LIU et al., 2007).

4.2.1.2 Eletrofusão

Uma das metodologias de produção de embrião $4n$ é a eletrofusão. Durante este procedimento, os embriões são colocados entre dois eletrodos em tampão de fusão e expostos ao estímulo fusogênico durante um período muito curto (DARABI et al., 2008). Pode ser realizado sem a remoção da zona pelúcida (LANDRY, 2005).

Bates et al. (1987) e Mc Laughlin (1993) relataram a realização da eletrofusão através da utilização de um pulso de corrente direta para ligar duas células por poros de abertura nas membranas entre essas células. Os poros fecham rapidamente e as pontes citoplasmáticas entre as duas células se ampliam até que elas se fundem para formar uma única célula.

Razza (2011) testou vários parâmetros diferentes para a eletrofusão, como a presença ou não de um pulso para o pré-alinhamento (5 kV/cm; 5 s), número de pulsos elétricos (1 ou 2), intensidade da voltagem (0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,4 e 5,0 kV/cm) e duração do eletrochoque (20; 25; 50 e 60 μ s). O melhor resultado

observado, com taxa de fusão de 93% foi com o uso de apenas um pulso de 0,75 kV/cm durante 60 μ s.

Entretanto, Darabi et al. (2008) testando os efeitos da voltagem e da duração do pulso elétrico na taxa de produção de blastocisto, observou que a voltagem de 1 kV/cm durante 60 μ s obteve maior proporção de blastocistos produzidos em relação aos outros valores testados; o que mostra que nem sempre uma alta taxa de fusão e/ou clivagem, corresponde-se com a maior porcentagem de blastocistos obtidos.

Esta metodologia de produção de embriões tetraploides pode apresentar alguns efeitos indesejáveis, como por exemplo, a lise celular e a aquisição de equipamentos mais sofisticados, o que torna o procedimento caro.

4.2.1.3 Inibição da clivagem

Os inibidores do ciclo celular por exemplo a Citocalasina B, tem sido utilizado para impedir a citocinese, gerando assim embriões 4n. Este método de produção de embriões 4n foi descrito pela primeira vez utilizando embriões de camundongos no estágio de 2 células (SNOW, 1973). Os embriões foram colocados em 10 μ g/ml de citocalasina por cerca de 12 horas e, em seguida observados alguns eventos nucleares. Os núcleos dos embriões inibidos pela citocalasina se dividiram normalmente, embora a citocinese não tenha ocorrido, e os embriões de 2 células resultantes tornaram-se binucleados. Após a remoção da citocalasina, os dois núcleos migraram para o centro de cada célula e formaram uma placa metafásica única, e, portanto, um embrião tetraploide, com um núcleo 4n único incluído em uma única membrana nuclear por célula, fato ocorrido em 60% dos embriões tratados (SNOW, 1973).

4.2.1.4 Fusão de blastômeros

A fusão celular tem mostrado ser um método eficaz de produção de embrião 4n. Vírus Sendai inativado tem sido utilizado para fundir células e formar embriões 4n. A micromanipulação foi utilizada para injetar vírus Sendai entre os blastômeros de um embrião de rato no estágio de 2 células, o que resultou em 21% de taxa de fusão. A fusão celular mediada pelo vírus Sendai resultou em 4n uniforme nesse estudo. (O'NEILL et al., 1990).

O polietilenoglicol é um outro método de fusão celular que tem sido utilizado para gerar embriões 4n. Blastômeros de embriões em estágio de 4 células foram separados após a remoção da zona pelúcida e posteriormente ligados aos pares com fitohemaglutinina. A fusão celular foi realizada após as células terem sido incubadas durante 2 minutos em uma solução de polietilenoglicol 45%. Este tratamento resultou em fusão de 50% dos blastômeros tratados. (EGLITIS, 1980).

Spindle em 1981 utilizou uma exposição de 1 minuto ao polietilenoglicol 40% para fundir blastômeros de embriões em estágio de 2 células e com zona pelúcida. Foram obtidas taxas de 82% de fusão, demonstrando que a presença da zona pelúcida é favorável a esse procedimento. O uso de polietilenoglicol como mediador de fusão celular resultou em tetraploidia uniforme em ambos os estudos.

4.2.2 Complementação do embrião tetraploide

As tentativas de resgatar o fenótipo 4n e de produzir camundongos adultos com uma composição cromossômica 4n, resultou na produção de embriões em vários estudos (GRAHAM, 1971; LU e MARKET, 1980). Um blastômero a partir de um embrião 2n foi agregado a um blastômero 4n gerado a partir da fusão celular mediada por vírus, sendo que três dos seis blastocistos que foram transferidos resultaram no nascimento de um produto composto apenas por células do tipo 2n (GRAHAM, 1971). Todos os embriões 4n produzidos através do tratamento com citocalasina foram agregados com sucesso a embriões 2n na presença de fitohemaglutinina (LU e MARKET, 1980). Uma vez que os embriões atingiram o estágio

de mórula ou blastocisto, os mesmos foram transferidos para receptoras com a finalidade de completar a gestação. Neste estudo, 59 embriões foram transferidos, 13 dos quais sobreviveram a termo. Destes 13, apenas dois foram quiméricos ao nascimento, com a prole restante derivada apenas do embrião 2n. O resultado desses estudos iniciais foi a constatação de que embriões 4n agregados a um componente 2n poderia ser usado para produzir descendentes.

No estudo feito por Nagy et al. (1990) e Sembom et al. (2011), onde se realizou a agregação de células-tronco embrionárias (CTE) a embriões 4n, foi obtido o nascimento de camundongos derivados completamente das CTE e com células 4n localizadas somente nos tecidos placentários. Esse fato corrobora com o que foi encontrado por Beddington e Robertson (1989) quando eles mostraram que as CTE não contribuem muito para o tecido extra-embrionário após a agregação com embriões 2n, entretanto esse tipo de célula contribui para todos os tecidos do feto em desenvolvimento. Neste mesmo estudo de Nagy et al. (1990), foi realizada a agregação de embriões 4n com células diploides da MCI, resultando no nascimento de seis filhotes, sendo que destes, cinco se originaram completamente das células da MCI. Todos os camundongos derivados das CTE morreram logo após o nascimento, entretanto, o originado da agregação da MCI com células tetraploides sobreviveu até a idade adulta, sugerindo que o procedimento de agregação não era responsável pela diminuição da viabilidade da descendência a partir de CTE. Em um estudo subsequente utilizando o mesmo método de agregação de embriões 4n com uma linha de CTE consanguíneas, foi conseguido o nascimento de camundongos com CTE viáveis, demonstrando que, as CTE desempenham um papel crucial na determinação da capacidade de sobrevivência da prole após a complementação do embrião 4n (NAGY et al., 1993).

Estudos de outros grupos relataram resultados semelhantes com a utilização de embriões agregados $2n \leftrightarrow 4n$ (UEDA et al., 1995; TARKOWSKI et al., 2001; GOTO et al., 2002). Embriões 4n produzidos pelo tratamento com citocalasina foram agregados aos pares ou individualmente com CTE no estágio de 4 células, resultando em cinco descendentes vivos derivados completamente das CTE, sendo que três sobreviveram até a idade adulta e mais tarde se mostraram férteis (UEDA et al., 1995). Em outro estudo em que resultou no nascimento de oito filhotes vivos, três dos quais sobreviveram à idade adulta e mostraram ser férteis. Apenas um dos seis animais examinados teve contribuição das células 4n, sendo que esse tipo de

célula foi encontrada apenas no coração e no fígado. No entanto, 80% das membranas fetais examinadas eram derivadas de células 4n (TARKOWSKI et al., 2001). Um grupo de estudo distinto relatou que células 4n não foram encontradas em tecidos fetais de camundongos por 12,5 dias após a transferência, utilizando-se um único embrião 2n de 8 células agregado com um único embrião 4n de 4 células (GOTO et al., 2002). Esses estudos encontraram que o aumento do número de células 4n agregadas em proporção com as células 2n, aumenta as chances de sucesso.

Estudos de alocação celular da agregação de blastocistos de camundongos revelaram que a tetraploidia derivada de blastômeros não foram normalmente distribuídos pelo trofoectoderma do embrião agregado (EVERETT e WEST, 1998). Esses pesquisadores concluíram que as diferenças de ploidia resultaram da atribuição diferencial das células, tal como o tamanho e estágio de desenvolvimento do embrião agregado (EVERETT e WEST, 1998). A análise da morfologia de embriões agregados usando reconstrução tridimensional mostrou que a preparação das células 4n e 2n em agregados era muito limitado (EVERETT et al., 2000).

Tang et al. (2000). verificaram que as células maiores tenderam a se localizarem no trofoectoderma quando agregadas com células menores de mesma ploidia. Células 4n agregadas com células 2n, ambas com o mesmo tamanho, também foram encontradas no trofoectoderma. Este achado sugeriu que tanto a ploidia da célula, bem como o seu tamanho, determina a sua localização no interior do embrião agregado.

As técnicas para obtenção da complementação embrionária são basicamente duas: a agregação do tipo “sanduíche”, em que podem ser utilizados embriões e/ou células para se agregarem e a microinjeção celular na blastocele (Figura 2).

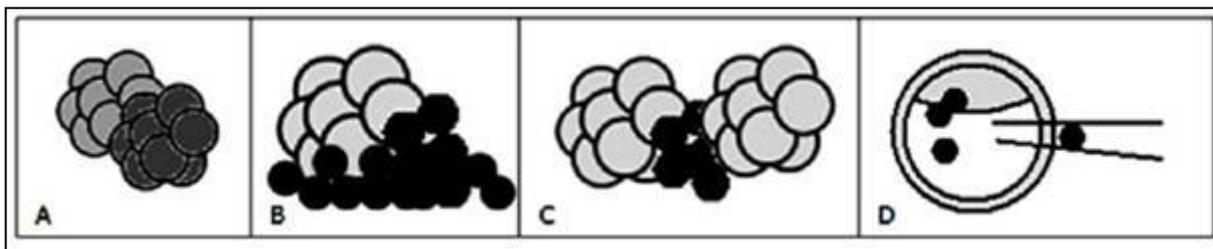


Figura 2: Técnicas de complementação embrionária. A) Agregação entre dois embriões de 8 células (diploides, $2n$, e tetraploides, $4n$); B) Cocultivo de um embrião de 8 células ($2n$ ou $4n$) com células tronco embrionárias (com diâmetro celular menor); C) Sanduíche de células tronco embrionárias entre dois embriões de 8 células ($2n$ ou $4n$); D) Microinjeção de células tronco embrionárias na blastocela de um embrião receptor.

Fonte: RAZZA, 2011.

Vale ressaltar que a técnica de complementação embrionária, tanto por microinjeção quanto por agregação, se encontra bem desenvolvida em camundongos, uma vez que, há o nascimento de várias linhagens de animais (WANG et al., 1997; KANG et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2009) , inclusive com fertilidade comprovada (LEE et al., 2007; LI et al., 2007; ZHAO et al., 2009). Sendo que, as células $2n$, ou seja, as que originaram o feto, foram obtidas da MCI de um embrião (WANG et al., 1997; LEE et al., 2007; LI et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2009; SEMBON et al., 2011) ou das iPS (KANG et al., 2009; ZHAO et al., 2009).

Contudo, diferentemente do que ocorre em camundongos, a complementação embrionária não está bem definida em bovinos, visto que, somente Berg (1982), James e West (1994) e Iwasaki et al. (2000) relataram o nascimento de bezerros oriundos da agregação de embrião $4n$ com células da MCI de um embrião $2n$ (Figura 3).



Figura 3: Bezerros derivados da agregação de células-tronco embrionárias com embriões tetraploides.

Fonte: IWASAKI et al., 2000.

Além disso, a complementação embrionária apresenta outras aplicabilidades, como foi descrito por Landry (2005) utilizando embriões bovinos oriundos de TN agregados à embriões 4n e, distintamente, relatado por Razza (2011), através do uso de embriões 2n taurinos agregados à embriões 4n zebuínos, fato realizado devido aos embriões de *Bos taurus* serem sensíveis ao calor. Em ambos trabalhos obteve-se embriões no estágio de blastocisto.

4.3. CÉLULAS-TRONCO

Considera-se como célula-tronco (CT) um tipo especial de célula que apresenta capacidade de se renovar e originar diferentes tipos celulares especializados, não possuindo nenhuma função específica até que essa receba um sinal do ambiente, direcionando-a a diferenciação em uma célula especializada (KIRSCHSTEIN, 2001). Esses sinais incluem danos aos tecidos como: trauma, fraturas, inflamação, necrose e tumores (PALERMO et al., 2005).

As CT podem ser definidas segundo três propriedades: I) auto-renovação, ou seja, capacidade de originar outra célula com características idênticas; II) habilidade

de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; e III) capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (VERFAILLIE, 2002). Assim, as CT são células indiferenciadas capazes de se diferenciar originando progenitores maduros e células efetoras completamente diferenciadas (SCHWINDT et al., 2005).

As CT podem ser classificadas segundo sua potencialidade em toti, pluri ou multipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero; as pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião (propriamente dito) e são provenientes da MCI do blastocisto (CTE); são classificadas como multipotentes as células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as CT mesenquimais (CTM) e neurais. Existem ainda células oligopotentes, capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem do que as células multipotentes, e as unipotentes, que originam apenas um único tipo celular maduro (WAGERS e WEISSMAN, 2004).

Quanto à natureza, as CT podem ser caracterizadas em embrionárias, fetais e adultas (SANTOS et al., 2004; ZAGO e COVAS, 2004; ZATZ, 2004; KUMAR et al., 2005; SCHWINDT et al., 2005, BYDLOWSKI et al., 2009; NIH, 2009) (Figura 4):

a) Embrionárias – só podem ser encontradas nos embriões e são classificadas como totipotentes ou pluripotentes, dado seu alto poder de diferenciação.

b) Fetais – estão presentes em abundância por todo o organismo em desenvolvimento e possuem maior potencial de auto-renovação. Teoricamente, podem ser isoladas de qualquer tecido, desde que a extração celular ocorra durante a sua formação no período fetal. No entanto, há importantes questões éticas envolvidas na extração dessas células em fetos humanos.

c) Adultas – são extraídas dos diversos tecidos, como medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical e placenta, sendo estas duas últimas consideradas células adultas devido a sua limitação de diferenciação. Também são encontradas no sistema nervoso, epitélio e outros tecidos. Entretanto estudos demonstram que a sua capacidade de diferenciação é limitada e a maioria dos tecidos não pode ser obtida a partir delas.

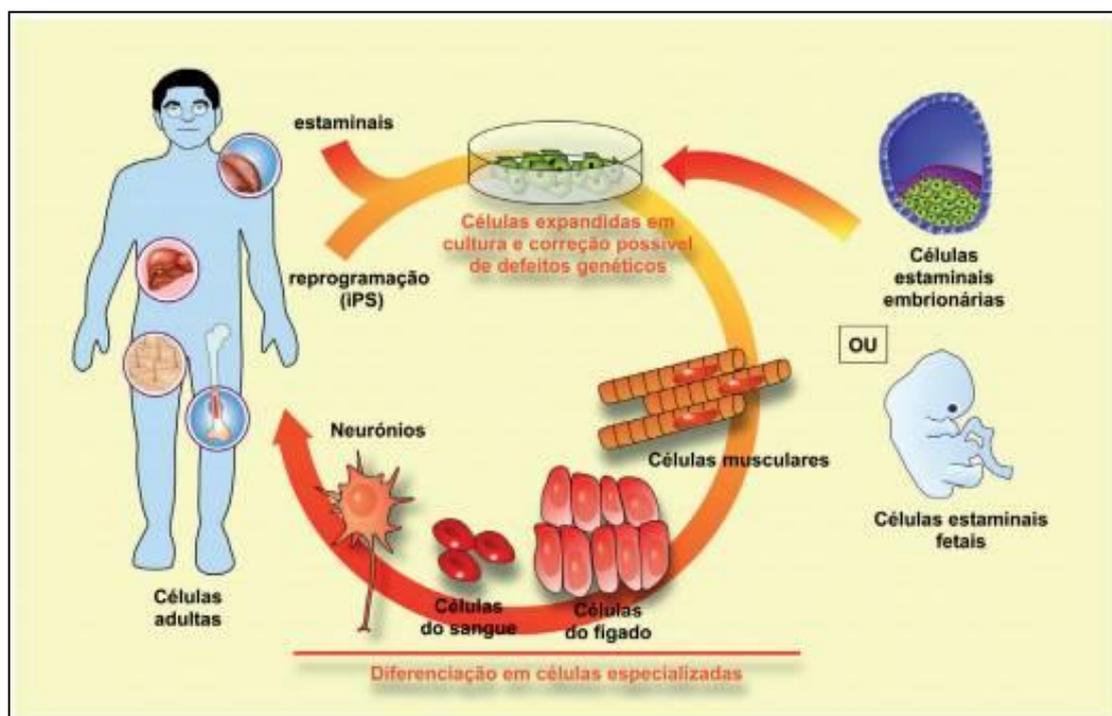


Figura 4: células-tronco.
Fonte: BRAGANÇA, et al., 2012.

4.3.1 Células-tronco adultas

É bem conhecido que em quase todos os tecidos de um organismo há constante substituição celular, sobretudo através da diferenciação das CT residentes. Essas células podem ser encontradas nos diferentes estágios da vida e, exceto em casos de dano tecidual, se dividem em baixa frequência apenas para manutenção de uma população de reserva nos tecidos. Por isso, tecidos adultos têm sido muito explorados como fonte para obtenção de CT, visto que praticamente todos eles apresentam CT residentes, denominadas células-tronco adultas (CTA) (ALBERTS et al., 1994).

Uma característica interessante e inerente a estas células é seu alto grau de plasticidade, de forma que são capazes de gerar células maduras de órgãos distintos (ZUK et al., 2002). Estas células, em determinados casos, promovem a manutenção das células viáveis ou ainda a regeneração de tecidos lesados (DUDAS et al., 2006; FARREL et al., 2011).

4.3.1.1 Células-tronco mesenquimais

Dentre as CTA mais exploradas estão as de origem mesenquimal (COLTER et al., 2000; KUDO et al., 2003). Estas células têm como principal apelo sua plasticidade, facilidade de isolamento e alta viabilidade em culturas *in vitro* (REYES et al., 2001).

As CTM podem ser encontradas no tecido muscular, pele, tecido adiposo, fígado, medula óssea, sangue periférico, cordão umbilical, entre outros tecidos (DENIS e CAPLAN, 2004; SCHWINDT et al., 2005; BROOKE et al., 2007).

Nos últimos anos, o tecido adiposo tem sido utilizado como uma fonte de CTM, que recebem a nomenclatura de CT derivadas do tecido adiposo (CTAD) e podem ser cultivadas *in vitro* (ZUK et al., 2002; PUISSANT et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005; MCINTOSH et al., 2006; PEREIRA et al., 2008; PERONI et al., 2008). As CTAD possuem vantagens em relação às CTM quanto à maior facilidade de coleta e a maior quantidade de CT disponível, constituindo cerca de 2% do total celular lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007).

4.3.1.2 Plasticidade das células-tronco adultas

Na última década, intensificaram-se as pesquisas que comprovam serem as CTA presentes em vários órgãos não serem apenas multipotentes, no sentido de que podem gerar as células constitutivas daquela linhagem ou órgão específico, mas também pluripotentes, já que também podem gerar células de outros órgãos e tecidos (GROTTO e NORONHA, 2003; SANTOS et al., 2004).

Quando a CTA não diferenciada se transforma na célula do tecido onde habita, diz-se que houve uma diferenciação. Porém, quando a CTA se transforma em uma célula de outro tecido, mudando seu fenótipo e assumindo características de outra célula, até mesmo oriunda de outro folheto embrionário, diz-se que houve uma transdiferenciação (ARAÚJO et al., 2005). Por exemplo, alguns estudos têm demonstrado que CT hematopoiéticas (CTH) e CTM, ambas derivadas do

mesoderma, são capazes de originar células musculares, também derivadas do mesoderma e células neurais, derivadas do ectoderma entre outros tipos celulares (MEIRELES et al., 2006) (Figura 5). A transdiferenciação é, então, definida como a transformação de um tipo celular em outro de linhagem diferente, e a plasticidade como a multiplicidade de opções de transdiferenciação das CTA em diversos tecidos (NIH, 2001; KUMAR et al., 2005).

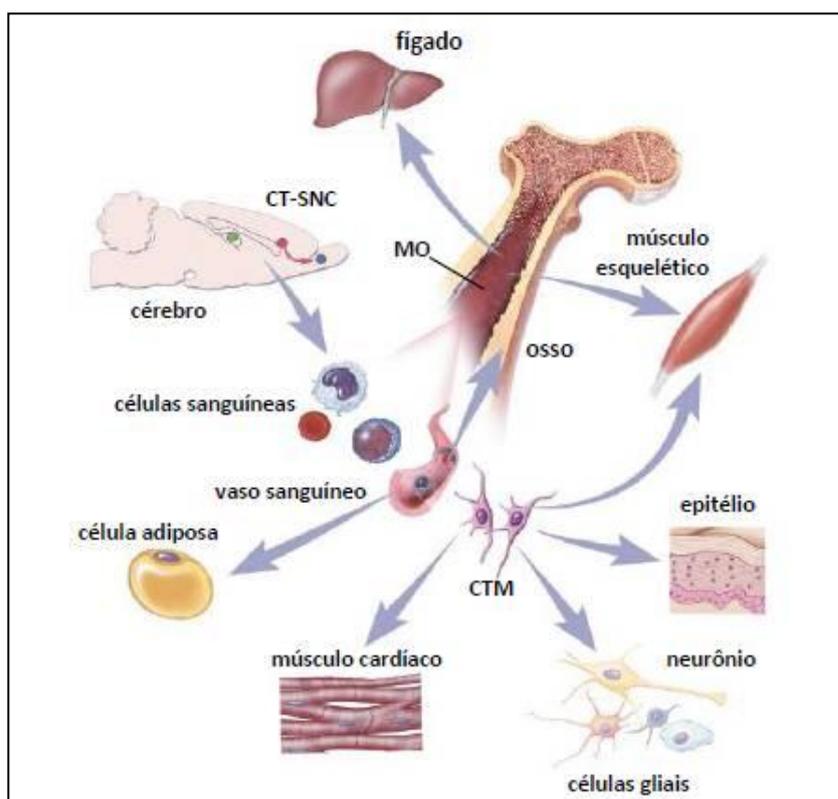


Figura 5: Representação de diferentes possibilidades de transdiferenciação das células-tronco adultas (CTA), demonstrando haver grande plasticidade celular. Célula-tronco do sistema nervoso central (CT - SNC). Célula-tronco mesenquimal (CTM). Medula óssea (MO).

Fonte: NIH, 2001.

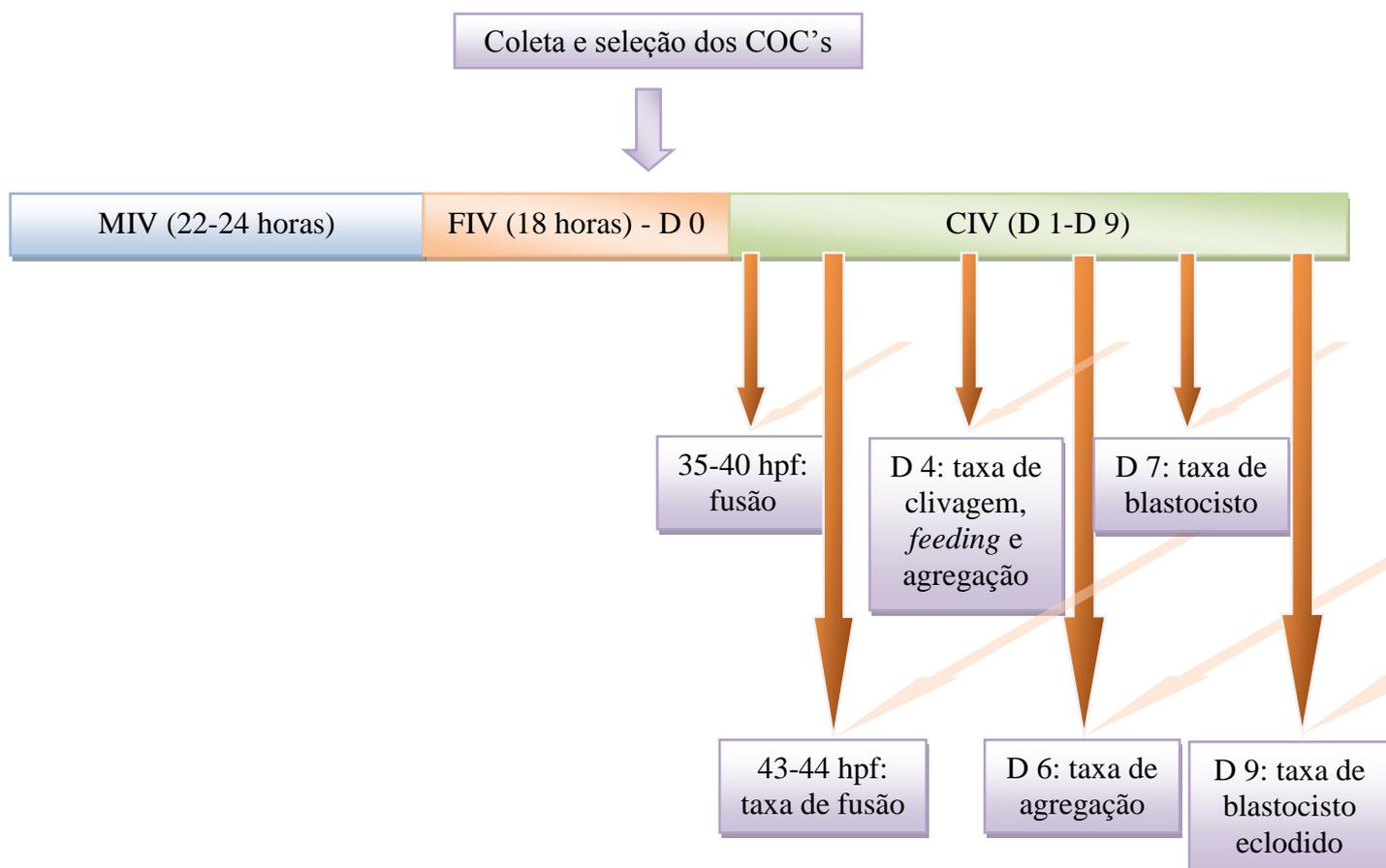
A transdiferenciação é um dos mecanismos propostos para explicar, por exemplo, a origem de células neurais a partir de células da MO. Neste mecanismo, a conversão de uma linhagem a outra ocorre diretamente pela ativação de um conjunto de genes que altera a especificidade celular. A conversão entre diferentes linhagens celulares também pode ocorrer via de desdiferenciação, um estágio intermediário, em que uma célula já especializada torna-se uma célula mais

primitiva, multipotente, para então poder se rediferenciar em outro tipo celular (RAFF, 2003; SCHWINDT et al., 2005).

Estudos têm evidenciado a plasticidade das CTH e CTM, podendo se diferenciar em células não medulares de vários tecidos, incluindo células do fígado (DAI et al., 2009), sistema nervoso central (MEZEY et al., 2000), pâncreas (LI et al., 2009), pulmões (GOMPERS e STRIETER, 2007), coração (LERI et al., 2006; UEMURA et al., 2006), tenócitos (BARREIRA, 2005; NIXON et al., 2008) e músculo esquelético (FERRARI et al., 1998).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Grupos experimentais

G1	Embriões de 2 células não fusionados
G2	Embriões de 2 células fusionados
G3	Embriões de 2 células fusionados e agregados
Controle	Embriões produzidos <i>in vitro</i>

5.2 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no setor de Tecnologia de Embriões do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

5.3 FONTE DE OÓCITOS

Os ovários de vacas foram coletados em abatedouros localizados na região de Campos dos Goytacazes – RJ e transportados ao LRMGA em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), acrescida de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), a 37°C. Dentro de 2-3 horas da coleta dos ovários, folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram puncionados com agulha 18 G adaptada à seringa de 10 mL. Os complexos *Cumulus*-oócitos (COCs) com pelo menos três camadas de células da granulosa e com citoplasma com finas granulações e homogêneo, foram lavados com meio 199 tamponado com hepes, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Anexo).

5.4 MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS

Grupos de 20 oócitos foram maturados em gotas de 100 µL de meio de maturação 199 com sais de Earle, acrescido de 20 mM de NaHCO₃ e suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH, 5,0 µg/mL de LH, 0,2mM de piruvato de sódio, 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Anexo). Essas gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas por um período total de 22-24 horas de maturação, em placa de Petri de 35 mm x 10 mm e em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade.

5.5 PREPARO DO SÊMEN E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS

Sêmen congelado de um único touro com fertilidade comprovada foi utilizado em todo o experimento e o aquecimento da palheta foi realizado em água a 37°C por 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Mini Percoll com densidade descontínua (45% sobre 90% - Anexo) e centrifugado a 1.700g por 15 minutos em centrífuga Mini Spin da Eppendorf®. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em Talp-sp acrescido de 10% de albumina sérica bovina (BSA) fração V, piruvato de sódio, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Anexo) e centrifugado por mais 5 minutos a 1.700g na mesma centrífuga.

Após a centrifugação os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade (lâmina e lamínula) e concentração (câmara de Neubauer), ambos sob microscopia óptica, e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização para uma concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL.

Durante a centrifugação do sêmen, os COCs já maturados foram lavados quatro vezes no meio Talp-sp acrescido de 10% de BSA fração V, piruvato de sódio, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Anexo) e uma vez no meio de fertilização.

O meio de fertilização consistiu de TALP-FIV suplementado com 0,006 g/mL de BSA livre de ácidos graxos, 0,21mM de piruvato de sódio, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 20 µg/mL de heparina e 44 µL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) (Anexo).

Posteriormente, foi efetuada a fertilização *in vitro* (FIV) utilizando grupos de 20 oócitos para 50 µL de meio de fertilização cobertos por óleo mineral, permanecendo incubados por um período de 18 horas, a 38,5°C, em 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade.

5.6 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Cerca de 18 horas após a fertilização (hpf) os espermatozoides circundantes aos prováveis zigotos foram removidos por pipetagens sucessivas. Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados 5 vezes em meio de cultivo tamponado com hepes, sendo então transferidos para gotas de 100 μ L (10 oócitos/gota), cobertas com óleo mineral.

O meio de CIV utilizado foi o SOF (do inglês “synthetic oviduct fluid”), acrescido de 2,5% de SFB, 0,006 g/mL de BSA fração V, 0,2 mM de piruvato de sódio, 2% de BME (Solução de aminoácidos – 50 x), 1% de MEM (Solução de aminoácidos não essenciais – 100 x), 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, (Lindsay, 2010).

Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade. A troca parcial do meio de cultivo foi realizada no 4º dia de cultivo (D 4, tendo o D 0 como o dia da FIV), quando foram retirados 70 μ L do meio presente na gota, juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentando o mesmo volume de meio de cultivo fresco (no “feeding” foi utilizado 5% de SFB).

5.7 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES TETRAPLOIDES

Cerca de 35-40 hpf, embriões de duas células, caracterizados pela presença de um eixo interblastômeros com nítida separação das células entre si, foram selecionados, retirados do meio de CIV e lavados em gotas do meio SOF supracitado. Em seguida, eles foram colocados por um minuto em meio de fusão (40% de polietilenoglicol em meio 199 com hepes e 3 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos) (SPINDLE, 1981). Logo após, os embriões foram lavados quatro vezes em meio de cultivo antes de retornarem para a incubadora e o CIV propriamente dito, conforme descrito anteriormente.

O resultado da fusão foi avaliado 3-4 horas após a passagem dos embriões pelo meio contendo polietilenoglicol, quando os blastômeros fundidos corretamente

perderam o eixo interblastomérico e apresentaram uma membrana citoplasmática única em todo o perímetro embrionário. Posteriormente, estes foram mantidos em cultivo até o momento da manipulação para a agregação das células-tronco (D4).

5.8 CARIOTIPAGEM EMBRIONÁRIA

Cerca de 72 horas após a FIV, os embriões foram transferidos para uma solução de Demecolcina 0,01 µg/mL cultivados em SOF (D1925, Sigma-Aldrich) por 6 horas. Posteriormente, os embriões foram expostos a solução hipotônica de Citrato de Sódio a 1% por 10 minutos a uma temperatura de 37°C. A fixação foi realizada em gotas de ácido acético:metanol (1:3 v.v) inseridas em lâminas previamente limpas. A coloração foi realizada em solução de Giemsa a 10 %, a que os embriões foram expostos por cerca de 10 minutos. Os cromossomos foram contabilizados sob objetiva de 1000 vezes.

5.9 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSEO BOVINO

5.9.1 Coleta do tecido adiposo

As células do tecido adiposo foram obtidas a partir de biópsias de tecido adiposo realizadas na região da prega da cauda de bovino adulto e sem raça definida. Para tal procedimento, precedeu-se a tricotomia de área suficiente para a coleta do material, seguido da antissepsia. Posteriormente, realizou-se a epidural e uma anestesia local em L invertido com Cloridrato de Lidocaína 2% e sem vasoconstritor. A avaliação da dor foi feita mediante a observação do comportamento do animal em relação ao estímulo doloroso. A remoção da gordura foi realizada cirurgicamente com o auxílio de pinças, tesouras e bisturi esterilizados.

A incisão de pele não foi suturada em virtude do espaço morto irreduzível deixado após a coleta do tecido, o que poderia predispor a uma contaminação. Realizou-se, portanto, curativo diário com iodopovidona 0,1% até completa cicatrização por segunda intenção.

Após este procedimento, o tecido coletado foi colocado em tubo cônico de 50 mL contendo solução de tampão fosfato sem cálcio e magnésio (PBSA), suplementado com 10 µL/mL de antibiótico/antimicótico e mantido a 37°C, sendo imediatamente transportado ao laboratório.

5.9.2 Isolamento, cultivo e expansão das células-tronco mesenquimais

O isolamento e cultivo das células-tronco foi baseado no protocolo preconizado por Nardi e Meirelles (2006 *apud* Bravo et al., 2012).

Em fluxo laminar, a amostra foi lavada duas vezes em PBS e transferida para uma placa de Petri, onde foi submetida à desagregação mecânica com o auxílio de pinça e bisturi. Pedacos de tecido adiposo foram fragmentados até estarem completamente desestruturados formando uma massa de aspecto pastoso.

Em seguida, o tecido adiposo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL contendo colagenase tipo I 0,3% 1:3 (volume de tecido:volume de solução) e incubado em banho-maria a 37°C, por 30 minutos, sendo agitado em vórtex a cada 10 minutos de incubação. Após este procedimento, 5% de SFB foi adicionado ao meio para inativação da enzima.

Após a degradação enzimática, os fragmentos do tecido adiposo foram inseridos em meio 199 sem hepes, suplementado com colagenase tipo I 0,06%, 10% de SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio e antibiótico/antimicótico, sendo distribuídos em tubo cônico de 15 mL e incubados em estufa umidificada com 5% de CO₂ atmosférico e a uma temperatura de 38,5°C, *overnight*.

Posteriormente, o tubo contendo as células foi mantido sob agitação no vórtex por alguns segundos e logo após centrifugado a 1.700g por 10 minutos na centrífuga Jouan[®], sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 5 mL de meio 199 sem hepes, acrescido de 10% de SFB, 0,2mM de piruvato e

antibiótico/antimicótico, colocado em garrafa de cultivo de 25 cm² e incubado em estufa umidificada com 5% de CO₂ atmosférico e a uma temperatura de 38,5°C.

Após dois dias, o meio de cultivo foi trocado e com isso foram eliminadas as células não aderidas. Além disso, o meio foi trocado a cada dois dias até atingir cerca de 80% de confluência, quando se realizou o procedimento de tripsinização da garrafa e passagem da cultura. Para isso, todo o meio antigo foi descartado, restando apenas a camada celular aderida. Adicionou-se 2 mL de tripsina a 0,05% e aguardou-se até todas as células se soltarem. Aspirou-se o conteúdo da garrafa para um tubo cônico de 15 mL e adicionou-se 100 µL de SFB para a inativação da tripsina. O conteúdo foi centrifugado a 1.700g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspendido em novo meio e novamente incubado. O procedimento foi repetido até a 3ª passagem sempre que a cultura atingiu 80% de confluência.

5.9.3 Criopreservação das células-tronco mesenquimais

Foram congeladas as células de 3ª passagem. Para isto foi realizada a tripsinização da cultura pelo uso de tripsina 0,05% por período suficiente para que todas as células se soltassem. Posteriormente, o conteúdo da garrafa foi aspirado e transferido para um tubo cônico de 15 mL, sendo então adicionados 100 µL de SFB para a inativação enzimática. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 1.700g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante.

O meio de congelamento utilizado foi o TCM 199 com hepes, suplementado com 20% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) 5ml.

A solução de criopreservação contendo as células foram criopreservadas em criotubos, sendo primeiro colocadas em freezer a -70°C por 12 horas e logo em seguida submersas em nitrogênio líquido.

5.9.4 Descongelamento e cultivo celular

Os criotubos foram descongelados à temperatura ambiente com movimentos de fricção entre as mãos.

O conteúdo foi ressuspensão em 5 mL de meio de cultivo (SOF) e centrifugado a 1.700g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* depositado em garrafas de 25 cm² de cultivo celular.

5.10 COMPLEMENTAÇÃO EMBRIONÁRIA PELA AGREGAÇÃO CELULAR

Oócitos bovinos foram maturados, fertilizados, cultivados e fusionados conforme descrito anteriormente.

Embriões 4n no estágio de desenvolvimento de pré-compactação (8-16 células) foram submetidos ao tratamento com solução de protease a 0,5% por tempo suficiente para que a zona pelúcida fosse removida.

Em seguida, os embriões foram lavados em meio 199 com hepes e transferidos para solução de 500 µg/mL de fitohemaglutinina, por pelo menos 5 minutos.

Cada embrião 4n foi colocado juntamente com 6 µL de células-tronco 2n em microtubos para centrifuga acompanhados com uma ponteira de micropepita preenchida com algodão, para permitir a gazeificação (Figura 6) contendo 50 µL de meio de CIV (descrito acima), cobertos com óleo mineral e incubados a 38,5°C em bolsas plásticas contendo 5% de CO₂, 90% de N₂ e com máxima umidade. Os complexos celulares 4n+2n foram mantidos em estreito contato físico por 48 horas visando a agregação. Uma vez agregados, observando os grúmulos celulares aderidos ao blastomóros estes foram cultivados individualmente em gotas de 10 µL de SOF e suplementos até o estágio de blastocisto expandido (D 8 a D 9), atmosfera trigás.

Foram realizadas 6 replicatas para a produção de embriões geneticamente idênticos pela agregação de 4n, obtidos pela fusão dos blastômeros com o PEG e

células 2n, produzidas pelo cultivo de células-tronco originárias de tecido adiposo bovino, não possuindo vacúolos



Figura 6: Microtubos para centrifuga utilizados para realizar a agregação do embrião tetraploide com as células-tronco diploides.

5.11 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O CIV foi realizado por 9 dias. Durante esse período, as taxas de desenvolvimento embrionário foram avaliadas, sendo divididas em 6 etapas: (1) avaliação da clivagem 35-40 hpf, onde foram selecionados os embriões que chegaram ao estágio de 2 células, para assim, passarem por posterior fusão, (2) avaliação da taxa de fusão 3-4 horas após a passagem pelo polietilenoglicol, avaliado pela perda do eixo entre os blastômeros; (3) avaliação da clivagem no D 4; (4) avaliação da taxa de agregação 48 horas após o procedimento; (5) no D 7, foi avaliada a taxa inicial de embriões que alcançaram o estágio de blastocisto; (6) e no D 9 a taxa final de blastocistos para embriões agregados e eclodidos para os demais.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico utilizado foi o SAS 9,2 (2008). O método da análise de variância pelo procedimento GLM para dados desbalanceados foi utilizado para verificar se existiram diferenças entre as variáveis a serem estudadas. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, excetuando-se a cariotipagem que foi analisada pelo teste t. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO BOVINO

Com a utilização da colagenase para degradar o tecido adiposo, obteve-se uma cultura em monocamada de células aderentes ao plástico e com formato fibroblástico, característica de células-tronco mesenquimais, considerados por Dominici et al., 2006 e outros autores que realizaram pesquisas em equinos (CARVALHO, 2009), cães (VIDAL et al., 2007), camundongos (SILVEIRA et al., 2010).

A técnica de cultivo celular utilizada neste trabalho, bem como o procedimento de tripsinização com tripsina 0,25% durante o cultivo foram semelhantes à técnica utilizada por autores como Bravo et al. (2012), cujos estudos baseiam-se em tecido adiposo equino e Zuk et al. (2001), estudando a técnica em humanos; portanto, pode-se inferir que o protocolo utilizado para bovinos pode ser baseado em outras espécies, já que foram obtidos resultados satisfatórios neste estudo. De acordo com Vidal et al. (2007) e Keating (2006), as CTM do tecido adiposo de equinos se expandem rapidamente em cultura, o que também foi observado nesta pesquisa, sendo semelhante às outras espécies mais estudadas.

Além disto, apesar da fonte mais acessível de células-tronco adultas no momento ser a fração de células mononucleares originadas da medula óssea, as CTM advindas de diversos tecidos vem ganhando espaço nas pesquisas e são consideradas opções promissoras em virtude de suas características, como abundância e facilidade de obtenção.

O protocolo utilizado neste trabalho, para isolamento e cultivo das CTM advindas do tecido adiposo de bovinos pode ser considerado eficiente, tendo em vista a celularidade e morfologia.

Na Figura 7, encontram-se imagens das células obtidas da cultura de tecido adiposo de bovinos. Observar as características morfológicas nas diferentes passagens, caracterizando e validando a técnica de extração das mesmas.

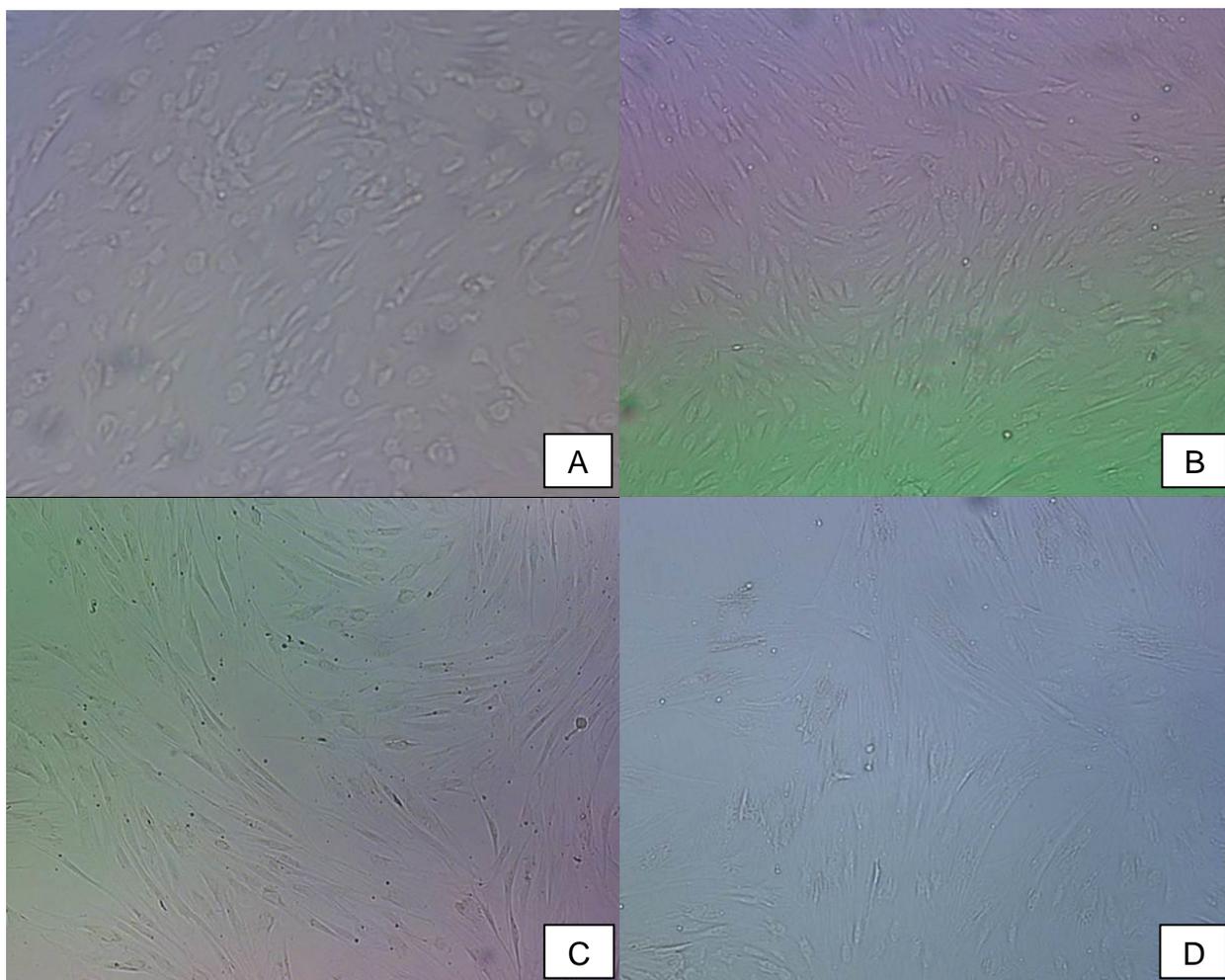


Figura 7: Células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo bovino em distintas passagens: A) 1ª passagem; B) 2ª passagem; C) 3ª passagem; D) 4ª passagem. Aumento de 100 X.

6.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES TETRAPLOIDES

Os resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões, especialmente quanto às taxas de formação de blastocistos (25% a 34,4% para Controle), dos embriões não tratados, ou seja, produzidos convencionalmente, foram um pouco variáveis. A produção *in vitro* pode apresentar tais variações, dentro de um mesmo laboratório, devido a alguns fatores, como o lote do meio, qualidade dos oócitos que pode variar de acordo com o estado nutricional dos animais, e que está diretamente relacionado ao período de chuvas e qualidade de pastagem, regulagem da estufa, dentre outros. Entretanto, apesar do experimento ter sido todo executado por um

mesmo técnico, tais variações não comprometeram o principal objetivo do trabalho que visou à obtenção de estruturas $4n/2n$.

Quanto à formação de embriões tetraploides, relatam-se basicamente duas formas distintas, uma pelo uso de substâncias químicas, o PEG na fusão blastomérica e a citocalasina B em partenogénéticos, e outra através da eletrofusão dos blastômeros.

Em nosso experimento utilizamos o peg na concentração de 40% com tempo de Exposição de 1 minuto obtivemos o resultado de 91,5% sendo este superior ao descrito por Spindle 1981.

Na Figura 8 podem ser observadas as características dos embriões pré (A) e pós (B) fusão, quanto à avaliação morfológica do procedimento.

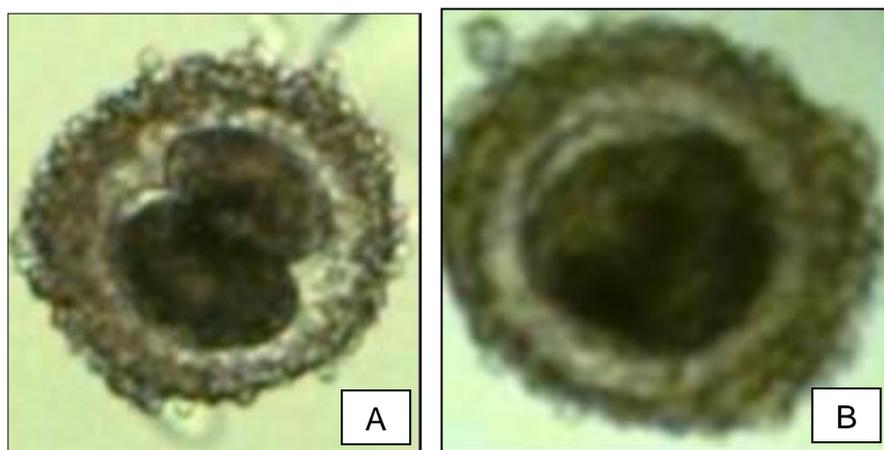


Figura 8: Embriões bovinos: A) no estágio de desenvolvimento de 2 células (35-40 hpf), observar o eixo entre os blastômeros bem definido; B) 3-4 horas após a fusão, observar perda do eixo interblastomérico. Aumento 600 X.

Além disso, observou-se que o desenvolvimento embrionário até blastocisto não foi afetado pelo PEG, o que corrobora os resultados encontrados por Spindle (1981), mostrando a baixa toxicidade da substância. Contrastantemente, Mintz (1962) apud Spindle (1981) em experimento conduzido em embriões sem a zona pelúcida constatou uma drástica redução na eficiência da fusão e aumento da lise celular, acentuando o papel fundamental dessa estrutura na estabilidade do embrião.

Na Figura 9-A, estão imagens ilustrativas dos primeiros embriões fusionados pelo PEG e competentes, quanto ao desenvolvimento até blastocisto eclodido, o que valida a técnica. Além disto, na Figura 9-B são retratados embriões diploides produzidos convencionalmente *in vitro*, mostrando a semelhança morfológica embrionária entre ambos, 2n e 4n.

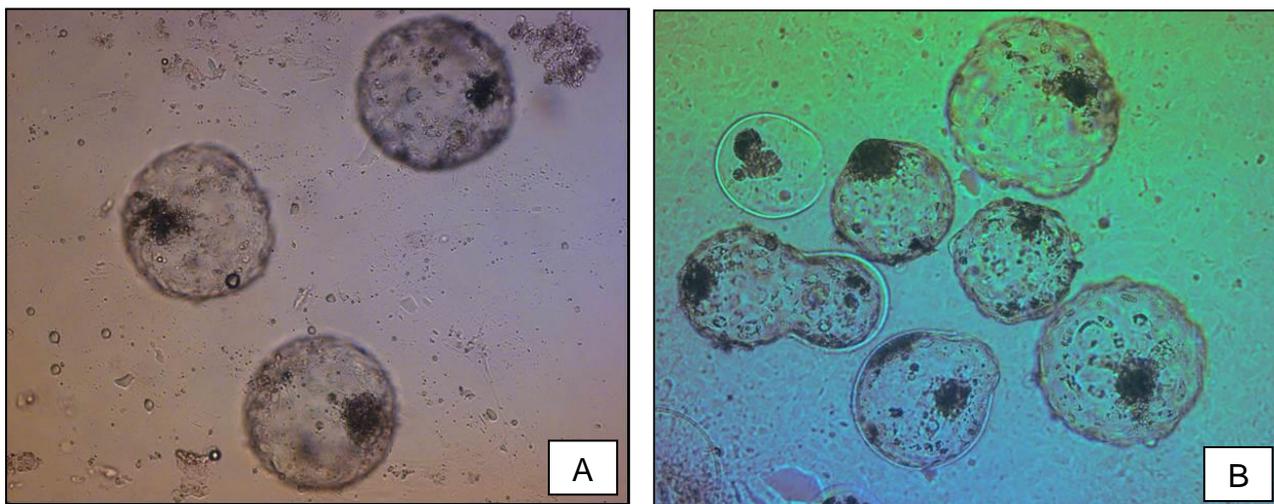


Figura 9: Blastocistos bovinos: A) 4n; B) 2n. Aumento 200 X.

Bai et al. (2011) publicaram um trabalho com embriões partenogênicos bovinos em que foi possível constatar que a taxa de clivagem foi similar entre os grupos tratados por citocalasina B e o controle, corroborando com os resultados desta pesquisa, entretanto, o desenvolvimento até blastocisto foi significativamente maior nos grupos tratados (25 a 28% x 15%, respectivamente), sendo que, no presente estudo não foi observado esta drástica mudança.

Na espécie bovina, Iwasaki et al. (2000), utilizando um pulso de 1,0 KV/cm por 25 μ s, obtiveram uma taxa de 75,5% de clivagem pós-fusão, enquanto Curnow et al. (2000) conseguiram 72,1% de clivagem pós-fusão, entretanto foi utilizado um pulso de 1,4 KV/cm durante 100 μ s. Ambos os resultados foram semelhantes aos observados por Razza (2011), no qual foi verificada uma taxa de clivagem pós-fusão de 71%. Contrastantemente, Darabi et al. (2008), com os mesmos parâmetros utilizados por Razza (2011) (0,75 KV/cm; 60 μ s) obtiveram, em termos numéricos absolutos, valores ligeiramente inferiores quanto a taxa de fusão (69 x 93%) e de

clivagem pós-fusão (66 x 71%) de embriões bovinos PIV. Desse modo, podemos inferir que os parâmetros validados por Razza (2011), como viáveis para a produção de embriões *Bos indicus* tetraploides, possam ser distintos dos padronizados para embriões *B. taurus*, visto as diferenças fisiológicas entre ambas as espécies.

No presente estudo, tivemos uma taxa de fusão aquém a obtida por Darabi et al. (2008), talvez pela utilização definida da espécie *B. taurus* por este autor. Pois Razza (2011) utilizando a fusão dos blastômeros através da eletrofusão como o autor anterior, obteve resultados de fusão semelhantes aos deste experimento (93% x 91,5%), entretanto a taxa de clivagem foi relativamente distinta, 71% e 77,8 %, respectivamente; valores bem superiores aos de Darabi e colaboradores (2008) que foi de 66%.

Além disto, quando analisado frente à outros autores, o presente trabalho mostra taxas superiores, tanto de fusão (SPINDLE, 1981), quanto de clivagem (IWASAKI et al., 2000; CURNOW et al., 2000).

Os dados do desenvolvimento embrionário, bem como a taxa de fusão dos embriões tratados pelo PEG estão descritos na Tabela 1, sendo que a taxa de fusão em percentagens obtida foi de 91,5 %, o que mostra a viabilidade da técnica. Além disso, o desenvolvimento pós-fusão dos 4n, quando comparado com os demais grupos experimentais, não demonstrou nenhuma diferença estatística ($p>0,05$).

Tabela 1: Valores médios da taxa de fusão e desenvolvimento embrionário.

	Nº estruturas	Taxa Fusão % (n)	Taxa Clivagem % (n)	Taxa Mórulas % (n)	Taxa Blastocistos % (n)	Taxa Blastocistos eclodidos % (n)
G1	40	-	72,5 (29) ^a	17,5 (7) ^a	25 (10) ^a	10 (4) ^a
G2	59	91,5 (54)	72,8 (43) ^a	18,6 (11) ^a	30,5 (18) ^a	11,8 (7) ^a
Controle	285	-	77,5 (221) ^a	9,8 (28) ^a	34,4 (98) ^a	15,4 (44) ^a

G1: Embriões de 2 células, G2: Embriões de 2 células fusionados, Controle: Embriões fertilizados e cultivados *in vitro*.

^{aa} Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P<0,05$).

A análise cromossômica de alguns tetraploides derivados *in vitro* mostrou que 21,21% dos embriões cariotipados possuíam de fato o dobro de cromossomos

quando comparado ao grupo Controle (Tabela 2 e Figura 10-A), enquanto que os embriões não fusionados tinham um conjunto de cromossomos diploide (Tabela 2 e Figura 10-B).

Tabela 2: Cariotipagem embrionária.

	Nº estruturas	Taxa não formação de placa metafásica % (n)	Taxa Aneuploidia % (n)	Taxa Diploidia % (n)	Taxa Tetraploidia % (n)
G2	33	48,48 (16) ^a	21,21 (7) ^a	9,09 (3) ^a	21,21 (7) ^a
Controle	14	42,857 (6) ^a	14,28 (2) ^a	42,857 (6) ^a	0 (0) ^b

^{aa} Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

^{ab} Valores com letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

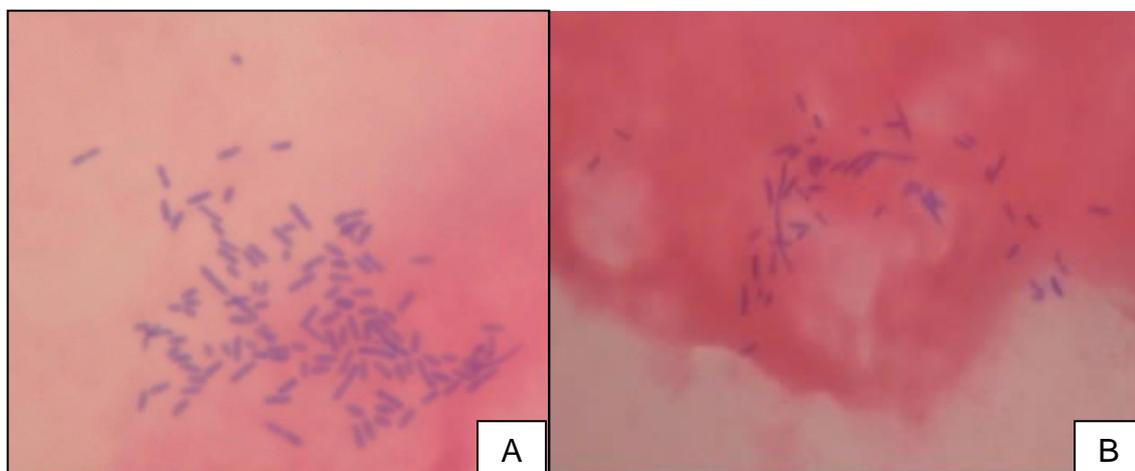


Figura 10: Cariotipagem dos embriões bovinos: A) 4n; B) 2n. Aumento 1000X.

6.3 AGREGAÇÃO EMBRIONÁRIA

Os agregados 4n/2n, tiveram taxas pouco elevadas de agregação (59,2%) e de blastocistos (9,8%) quando comparadas com as de Boediono et al. (1999). Estes

autores usando ágar como agente aglutinador obtiveram taxas de 93 e 88%, respectivamente na agregação e na formação de blastocistos bovinos de embriões PIV e partenogênicos. Entretanto, as diferenças entre os agentes aglutinadores utilizados, a origem do embrião agregado, além de potenciais diferenças inerentes aos sistemas de PIV, poderiam ser responsáveis por estas diferenças observadas.

Na Tabela 3 podemos observar dados de desenvolvimento embrionário entre os grupos agregados para produzir blastocistos bovinos geneticamente idênticos (G3) e o grupo controle. Observar a taxa de fusão (81,9%) que foi inferior aos embriões da Tabela 1.

Do total de 76 embriões que passaram pela agregação, obtivemos uma taxa de 59,2% de agregados. Além disso, vale destacar que as taxas de produção de mórulas e blastocistos se diferenciaram estatisticamente ($P < 0,05$) entre os grupos estudados.

Tabela 3: Dados comparativos de desenvolvimento embrionário.

	Nº estruturas	Taxa Fusão % (n)	Taxa Clivagem % (n)	Nº agregados	Taxa Agregação % (n)	Taxa Mórulas % (n)	Taxa Blastocistos % (n)	Taxa Blastocistos eclodidos % (n)
G3	133	81,9 (109)	74,4 (99) ^{aa}	76	59,2 (45)	6 (8) ^a	9,8 (13) ^a	-
Controle	516	-	59,9 (309) ^a	-	-	19,6 (101) ^b	25 (129) ^b	7,5 (39)

^{aa} Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

^{ab} Valores com letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

Recentemente, Hiriart et al. (2013) agregando embriões 4n com blastômeros expressando a Proteína Fluorescente Verde (eGFP), tanto em situações sincrônicas quanto assincrônicas, pôde concluir que quando há assincronia celular, há um favorecimento na presença das células em estágio mais avançado de desenvolvimento na MCI. Vale ressaltar que a complementação assincrônica é uma técnica antiga que não tem sido amplamente utilizada em bovinos. No entanto, no início de 1978, teve o primeiro relato em ratos de que a assincronia entre as células de um embrião intacto, indica que as primeiras células em estágio de 8 células,

tende a contribuir muito mais para a MCI (KELLY et al., 1978 *apud* HIRIART et al., 2013).

As altas taxas de blastocistos observadas após a agregação de embriões de acordo com estudos anteriores utilizando a complementação de produtos oriundos da técnica de TN (GAMBINI et al., 2012) (BOIANI et al., 2003; RIBEIRO et al., 2009), têm demonstrado que a agregação em estádios iniciais de desenvolvimento melhora as taxas de produção de blastocisto. Bem como, o aumento do número de bovinos clonados por agregação melhora as taxas de clivagem, blastocistos e o número de células por embrião, além de aumentar as taxas de gestação (PEDERSEN et al., 2005).

Somado a isto, o padrão não aleatório de distribuição celular, em decorrência da ploidia celular, está classicamente estabelecido em camundongos (NAGY et al., 2003). Entretanto, existe a possibilidade de que nem todos os embriões fundidos tornem-se efetivamente tetraploides, principalmente se os prováveis tetraploides, a serem agregados, estiverem em fases pós-compactação (IWASAKI et al., 1999). Tal fato sugere que a escolha por embriões em estágios de pré-compactação, ser a melhor opção para a produção de $4n/2n$ por agregação, fase escolhida no presente experimento.

Na Figura 11, encontram-se imagens de embriões agregados. O procedimento de agregação foi realizado quando o desenvolvimento embrionário estava em estágio de pré-compactação, ou seja, de 8-16 células, entretanto é possível verificar que o complexo $4n/2n$ chegou a possíveis blastocisto, o que é comprovado pelo aparecimento da blastocele.

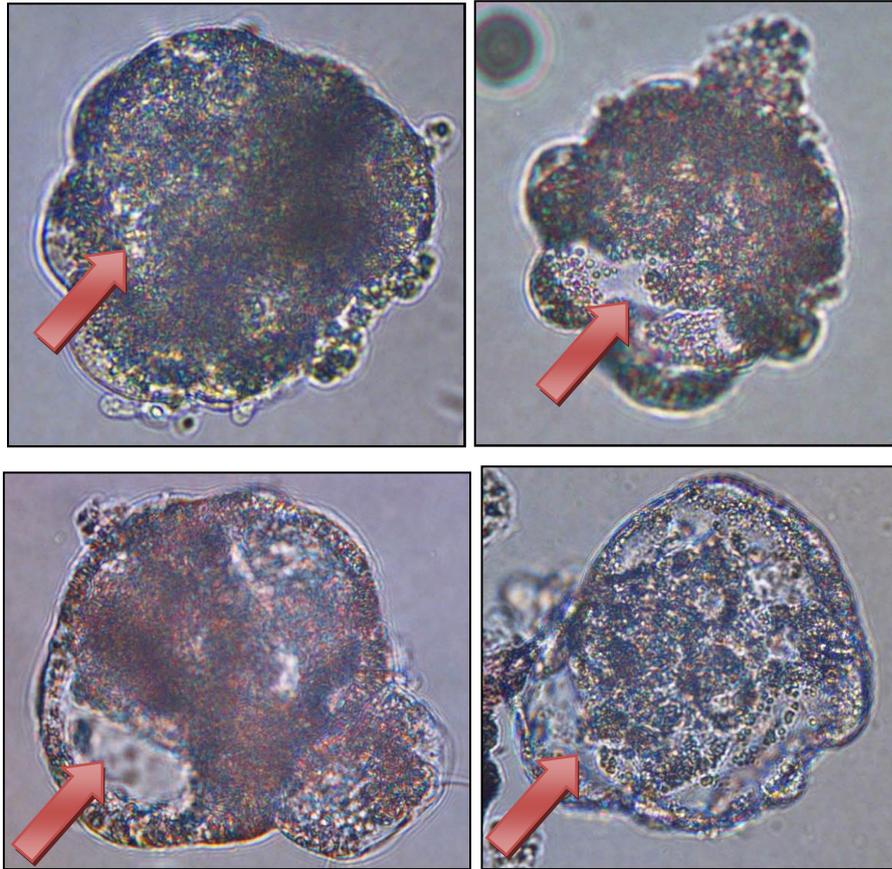


Figura 11: Blastocistos formados pela agregação de embriões bovinos tetraploides e células-tronco provenientes de tecido adiposo. Observar a blastocele indicada pela seta. Aumento de 400 X.

7 CONCLUSÃO

A produção de embriões bovinos tetraploides pelo uso do PEG, e nas condições do laboratório onde o experimento foi executado, validaria, no que diz respeito ao aspecto morfológico, como também a obtenção de cultura de células-tronco originárias de tecido adiposo bovino.

A hipótese de que a agregação de embriões tetraploides e células-tronco adultas provenientes de tecido adiposo bovino produziram embriões com desenvolvimento *in vitro*, incluindo a formação de blastocistos, semelhante aos embriões convencionais foi aceita, apesar da menor taxa de blastocistos $2n + 4n$ (9,8%) quando comparada àquela dos blastocistos produzidos convencionalmente (25%).

No entanto, pesquisas posteriores nesta área, que cooptem na inovulação destes embriões em receptoras para o estabelecimento de gestações, são necessárias, podendo ser confirmado a composição genotípica e fenotípica dos animais nascidos, validando o padrão não aleatório da distribuição das células tetraploides no agregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. B. D.; LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 3^a ed, editor. New York; 1994.

ARAÚJO, J. D.; ARAÚJO FILHO, J. D.; CIORLIN, E.; RUIZ, M.; RUIZ, L. P.; GRECO, O. T.; LAGO, M. R.; ARDITO, R. V. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v.4, n.4, p.357- 65, 2005.

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

BAI, C.; LIU, H.; LIU, Y.; WU, X.; CHENG, L.; BOU, S.; LI, G. P. Diploid oocyte formation and tetraploid embryo development induced by cytochalasin B in bovine. **Cellular Reprogramming**. V. 13, n. 1, 2011.

BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em eqüinos: avaliação clínica, ultra sonográfica e imunoistoquímica**. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BATES, G. W.; SAUNDERS, J. A.; SOWERS, A. E. Electrofusão. Principles and applications. In: SOWERS, A. E. (Ed.). **Cell Fusion**. Plenum Press, New York. p. 367 - 395, 1987.

BEDDINGTON, R. S.; ROBERTSON, E. J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. **Development**. 105, 733 - 737, 1989.

BERG, H. Fusion of blastomeres and blastocysts of mouse embryos. **Bioelectrochemistry Bioenergetic**. 9, 223 - 228, 1982.

BHOJWANI, S.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; ROSCHLAU, K.; KUWER, A.; BECKER, F.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Developmental competence

of HMC™ derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulose cells. **Journal of Reproduction and Development**, 51, 465-475, 2005.

BOEDIONO, A., SUZUKI, T., LI, L.Y., GODKE, R.A. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.159-170, 1999.

BOIANI, M.; ECKARDT, S.; LEU, N. A.; SCHOLER, H. R.; McLAUGHLIN, K. J. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? **EMBO J**; 22:5304–12, 2003.

BORDIGNON, V. Animal Cloning by Nuclear Transplantation: progress and future challenges. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 74-89, 2003.

BORDIGNON, V. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Bioteχνologias aplicadas à reprodução**, v. 2. p. 347-365. ed. Roca, São Paulo, 2008.

BRAGANÇA, J., TAVARES, A., BELO, J. A. Células **estaminais e medicina regenerativa**. Disponível em: http://canalbq.spb.pt/docs/canalBQ_0007.pdf. Acesso: 31 mar. 2012.

BRAVO, M. O.; MORAES, J. M.; DUMMONT, C. B. S.; FILGUEIRAS, R. R.; HASHIMOTO, H.H.; GODOY, R. F. Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco do tecido adiposo de equinos. **ARS Veterinária**, v. 28, n. 2, 066-074, 2012.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v.18, n.1, p.846-858, 2007.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; DUARTE, S. A.; JANZ, F. L.; CAVAGLIERI, R. C.; MASELLI, L. M. F. Células-tronco do líquido amniótico. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.31, supl.1, p.45-52, 2009.

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

CARVALHO, A. M. et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.132, n.2-4, p.303-306, 2009.

CIBELLI, J. Developmental Biology. A decade of cloning mystique. **Science**, v.316, n.5827, p.990-992, 2007.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proc Natl Acad Sci USA**. Mar 28; 97 (7): 3213-8; 2000.

CURNOW, E. C.; GUNN, I. M.; TROUNSON, A. O. Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.** 56, 372 - 377, 2000.

DAI, L. J.; LI, H. Y.; GUAN, L. X.; RITCHIE, G.; ZHOU, J. X. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. **Stem Cell Research**, Kidlington, v.2, n.1, p.16 - 25, 2009.

DARABI, M. R.; NASR-ESFAHANI, M. H.; BAHARVAND, H.; MARDANI, M.; KARIMI-JASHNI, H. Fusion and development of 2-cell bovine embryos to tetraploid blastocyst with different voltages and durations. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. V. 6, n. 4, 181 - 186, 2008.

DENIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Bone marrow mesenchymal stem cells. In: SELL, S. **Stem cells handbook**. Totowa: Human Press. cap.10, p.107-118, 2004.

DOMINICI, M.; LeBLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DUDAS, J. R.; MARRA, K. G.; COOPER, G. M.; PENASCINO, V. M.; MOONEY, M. P.; JIANG, S. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. **Ann Plast Surg**. May; 56 (5): 543-8; 2006.

EGLITIS, M. A. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. **J. Exp. Zool.** 213, 309 - 313, 1980.

EVERETT, C. A.; STARK, M. H.; WEST, J. D.; DAVIDSON, D.; BALDOCK, R. A. Threedimensional reconstruction of tetraploide diploid chimaeric mouse blastocysts. **J. Anat.** 196, 341 - 346, 2000.

EVERETT, C. A.; WEST, J. D. Evidence for selection against tetraploid cells in tetraploid – diploid mouse chimeras before the late blastocyst stage. **Genet. Res.** V. 72, p. 225 - 228, 1998.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178 – 191, 2006.

FARREL, E.; BOTH, S. K.; ODORFER, K. I.; KOEVOET, W.; KOPS, N.; O'BRIEN, F. J. In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells. **BMC Musculoskeletal Disord.** 12:31; 2011.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, Washington, v. 279, n.5.536, p.1528 - 1530, 1998.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143 - 152, 2007.

FOLCH, J.; COCERO, M.J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J.L.; DOMINGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; ROCHE, A.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍ, J.I.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J.F.; SÁNCHEZ BONASTRE, A.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, 71, 1026-1034, 2009.

FULKA, J.; FIRST, N. L.; LOI, P.; MOOR, R. M. Cloning by somatic cell nuclear transfer. **BioEssays**, v. 20, n. 10, p. 847-851, 1998.

GAMBINI, A.; JARAZO, J.; OLIVERA, R.; SALAMONE, D. F. Equine cloning: in vitro and in vivo development of aggregated embryos. **Biol Reprod**, 87:15. 1–9, 2012.

GAO, T.; ZHENG, J.; XING, F.; FRANG, H.; SUN, F.; YAN, A.; GONG, X.; DING, H.; TANG, F.; SHENG, H.Z. Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Cell Research**, 17, 135-150, 2007.

GOTO, Y.; MATSUI, J.; TAKAGI, N. Developmental potential of mouse tetraploid cells in diploid ↔ tetraploid chimeric embryos. **Int. J. Dev. Biol.** 46, 741 - 745, 2002.

GRAHAM, C. F. Virus assisted fusion of embryonic cells. **Acta Endocrinol. Suppl.** (Copenhagen). 153, 154 - 167, 1971.

GROTTO, H. Z. W.; NORONHA, J. F. A Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. São José do Rio Preto, v.25, n.3, 2003.

GURDON, J. B.; MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v.322, n.5909, p.1811-1815, 2008.

HIRASHIMA, M.; LU, Y.; BYERS, L.; ROSSANT, J. Trophoblast expression of fms-like tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal–fetal interface in the mouse placenta. **Proc Natl Acad Sci USA**. 100:15637–15642, 2003.

HIRIART, M. I.; BEVACQUA, R. J.; CANEL, N. G.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; SALAMONE, D. F. Production of chimeric embryos by aggregation of bovine *egfp* eight-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronous embryos. **Theriogenology**, 80, 357-364, 2013.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in musculus: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v. 23, n. 1, p. 9-18, 1981.

INÁCIO, J. C. **Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho**. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

IWASAKI, S.; CAMPBELL, K. H. S.; GALLI, C.; AKIYAMA, K.; IWASAKI S. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. **Biology of Reproduction**. 62, 470 - 475, 2000.

IWASAKI, S.; ITO, Y.; IWASAKI, S. In-vitro development of aggregates of bovine inner cell mass cells or bovine mammary cells and putative tetraploid embryos produced by electrofusion. **J Reprod Dev**; 45:65–71; 1999.

JAMES, R. M.; WEST, J. D. A chimaeric animal model for confined placental mosaicism. **Human Genetic**. 93, 603 - 604, 1994.

JAMES, R. M.; KLERKX, A.; KEIGHREN, M.; FLOCKHART, J. H.; WEST, J. D. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. **Developmental Biology**. 167, 213 - 226, 1995.

KANG, L.; WANG, J.; ZHANG, Y. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. **Cell Stem Cell**. 5, 135 - 138, 2009.

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

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. **Current Opinion in Hematology**, v.13, n.6, p.419–425, 2006.

KELLY, S. J.; MULNARD, J. G.; GRAHAM, C. F. Cell division and cell allocation in early mouse development. **Embryol Exp Morph**;48:37–51, 1978.

KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, New York, v.207, n.2, p.267 - 274, 2007.

KIRSCHSTEIN, R. **Stem cells: scientific progress and future research**. Bethesda: The National Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001.

KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow - derived stem cells. **Therapy**. 9: 754 - 758, 2002.

KUBIAK, J.; PALDI, A.; WEBER, M. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. **Development**. 111, 763 - 769, 1991.

KUDO, M.; WANG, Y.; WANI, M. A.; XU, M.; AYUB, A.; ASHRAF, M. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. **J Mol Cell Cardiol.** Sep; 35 (9): 1113-9; 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, realing and fibrosis. In: KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease.** 7ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. Cap.3, p 91-94.

LACERDA, P. M. O. **Aspectos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de pós-graduação em anatomia dos animais domésticos e silvestres, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LANDRY, A. M. **Reconstruction of nuclear transfer embryos in goats and cattle.** 2005. 210f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa interdepartamental em Ciência Animal, Universidade Estadual de Louisiana, Louisiana.

LEE, K. H.; CHUANG, C. K.; WANG, H. W.; STONE, L.; CHEN, C. H.; TU, C. F. An alternative simple method for mass production of chimeric embryos by coculturing denuded embryos and embryonic stem cells in Eppendorf vials. **Theriogenology** 67:228-237, 2007.

LERI, A.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Células da Medula Óssea e Reparo Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.87, n.2, 2006.

LI, X. Y.; JIA, Q.; DI, K. Q.; GAO, S. M.; WEN, X. H.; ZHOU, R. Y.; WEI, W.; WANG, L. Z. Passage number affects the pluripotency of mouse embryonic stem cells as judged by tetraploid embryo aggregation. **Cell Tissue Res**, 327: 607-614, 2007.

LINDSAY, U. G. **Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular.** 2010. 123f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de pós-graduação em reprodução animal, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIU, Y.; LI, G. P.; WHITE, K. L. Nicotine alters bovin oocyte meiosis and affects subsequent embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.** 74, 1473 - 1482, 2007.

LU, T. Y.; MARKET, C. L. Manufacture of diploid/tetraploide chimeric mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77, 6012 - 6016, 1980.

MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J. B.; FLOYDE, Z. E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J. P.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells – Tissue Specific Stem Cells**, New York, v.24, n.6, p.1246-1253, 2006.

MCLAUGHLIN, K. J. Production of tetraploid embryos by electrofusion. **Methods Enzymol.** 225, 919 - 930, 1993.

MEIRELLES, L. C.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, London, v.119, n.11, p.2204 - 2213, 2006.

MELLO, M. R. B. **Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo.** 2003. 82f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G.; MAKI, R. A.; MCKERCHER, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, Washington, v. 290, n. 5497, p. 1779 - 1782, 2000.

MINTZ, B. **Science** 138 (1962) 594.

NAGY, A.; GOCZA, E.; DIAZ, E. M. PRIDEAUX, V. R.; IVANYI, E.; MARKKULA, M.; ROSSANT, J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. **Development.** 110, 815 - 821, 1990.

NAGY, A.; ROSSANT, J.; NAGY, R.; ABRAMOW-NEWRLY, W.; RODER, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90, 8424 - 8428, 1993.

NAGY, A. Production of Chimeras. In: NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K.; BEHRINGER, R. *Manipulating the Mouse Embryo – A Laboratory Manual.* 3rd edition. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 453. 2003.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**, New York, v.174, n. 6, p.249 - 282, 2006.

NIH - National Institutes of Health. Department of Health and Human Services, 2001. **stem cells: Scientific progress and future research directions**. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>. Acesso em: 26 mar. 2012.

NIH - National Institutes of Health. Department of Health and Human Services, 2009. **Stem Cell Basics**. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>. Acesso em: 26 mar. 2012.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.69, p.928 - 937, 2008.

O'NEILL, G. T.; SPEIRS, S.; KAUFMAN, M. H. Sex-chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos. **Cytogenet. Cell Genet.** 53, 191 - 195, 1990.

ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T. et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, v. 289, n. 5482, p. 1188-1190, 2000.

PALERMO, A.T.; LABARGE, M.A.; DOYONNAS, R.; POMERANTZ, J.; BLAU, H.M. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. **Developmental Biology**, Amsterdam, v.279, n.2, p.336-344, 2005.

PEDERSEN, H. G.; SCHMIDT, M.; SANGILD, P. T.; STROBECH, L.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. **Mol Cell Endocrinol**, 234:137–43, 2005.

PEREIRA, A. F. **Transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em ruminantes: aspectos moleculares e produção de embriões**. 2010. 148f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

PEREIRA, I. S. O.; PONTES, P.; EÇA, L. P.; FERREIRA, A. T.; MAZZETTI, P. M. V.; SILVA, L.; SOUZA, F. C. Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, São Paulo, v.26, n.3, p.11-16, 2008.

PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIE, M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.314, n.2, p.603 - 615, 2008.

PORCIUNCULA, P. M. **Ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio**. 2007. 80p. Tese (Mestre em zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.129, n.1, p.118–129, 2005.

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: Fact or artifact? **Annual review of cell and developmental biology**, Palo Alto, v.19, n.1, p.1-22, 2003.

RAZZA, E. M. **Produção de quimeras embrionárias bovinas mediante a agregação de embriões diplóides (*Bos taurus*) e tetraplóides (*Bos indicus*)**. 2011. 79p. Tese (Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia) – Programa de pós-graduação do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C. M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**. Nov 1; 98 (9): 2615-25; 2001.

RIBEIRO, E. S.; GERGER, R. P.; OHLWEILER, L. U.; ORTIGARI Jr, I.; MEZZALIRA, J. C.; FORELL, F. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. **Cloning Stem Cells**;11:377–86; 2009.

RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E.Z.Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, Paris, v.87, n.8, p. 125 - 128, 2005.

SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.6, p.490 - 495, 2004.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.13-19, 2005.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J. et al. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 859, 2002.

SILVEIRA, R. F. M.; FERREIRA, L. C.; GINANI, F.; BARBOZA, C. A. G. Influência do protocolo laboratorial no rendimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 9 (1), 17-21, 2010.

SNOW, M. H. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. **Nature**. 244, 513 - 515, 1973.

SEMBOM, S.; FUCHIMOTO, M.; IWAMOTO, S.; SUZUKI, K.; YOSHIOKA, A.; ONISHI, A. A simple method for producing tetraploid porcine parthenogenetic embryos. **Theriogenology**. 76, 598 - 606, 2011.

SOMFAI, T.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J. Diploid porcine parthenotes produced by inhibition of first polar body extrusion during *in vitro* maturation of follicular oocytes. **Reproduction**. 132, 559 - 570, 2006.

SPINDLE, A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. **Exp. Cell Res**. 131, 465 - 470, 1981.

TANG, P. C.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I.; WEST, J. D. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts. **Zygote**. 8, 33 - 43, 2000.

TARKOWSKI, A. K.; OZDZENSKI, W. CZOLOWSKA, R. Mouse singletons and twins developed from isolated diploid blastomeres supported with tetraploid blastomeres. **Int. J. Dev. Biol**. 45, 591 - 596, 2001.

TRECENTI, A.S.; Zappa, V. CLONAGEM ANIMAL: REVISÃO DE LITERATURA & ANIMAL CLONING: LITERATURE REVIEW. REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA – ISSN: 1679-7353. Ano XI – Número 20 – Janeiro de 2013 – Periódicos Semestral – www.revista.inf.br – www.editorafaef.com.br – www.faef.edu.br.

UEDA, O.; JISHAGE, K.; KAMADA, N.; UCHIDA, S.; SUZUKI, H. Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. **Exp. Anim.** 44, 205 - 210, 1995.

UEMURA, R.; XU, M.; AHMAD, N.; ASHRAF, M. Bone Marrow Stem Cells Prevent Left Ventricular Remodeling of Ischemic Heart Through Paracrine Signaling. **Circulation Research**, Baltimore, v.98, n.11, p.1414-1421, 2006.

VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v.12, n.11, p.502-508, 2002.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, n.7, p.613-622, 2007.

VISINTIN, J. A.; MELLO, M.R.B.; MILAZZOTTO, M.P.; Mayra Elena Ortiz D'Ávila ASSUMPÇÃO, M.E.O.D. Clonagem e transgenia animal. *Ciênc. Vet. Tróp.*, Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.139-144, abril, 2008.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, 116: 639-48, 2004.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Letters to Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369-374, 1998.

WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J.; LETOURNEAU, G. E. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. **J. Cell Sci.** 22, 531 - 545, 1976.

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

WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K. et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Scienceexpress**. Disponível em: www.scienceexpress.org. Acesso em: 29 abril 2014.

YAMAMOTO, F. K.; MIYAGOSHI, M.; YAMAGISHI, H. Cell cycle, morphology and pluripotency of octaploid embryonic stem cells in comparison with those of tetraploid and diploid cells. **Human Cell**, 22: 64-71, 2009.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.

ZATZ, M. Clonagem e célula-tronco. **Estudos avançados**, São Paulo, v.18, n. 51, 2004.

ZHAO, X. Y.; LI, W.; LV, Z. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. **Nature**. 461, 86 - 90, 2009.

ZHU, Z. Y.; CHEN, D. Y.; LI, J. S. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. **Biol. Reprod.** 68, 943 – 946, 2003.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, San Francisco, v.7, n.2, p.211 - 228, 2001.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, H.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.13, n.2, p.4279 - 4295, 2002.

ANEXO

MEIOS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

MEIO DE LAVAGEM DE OÓCITOS

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM-199 C/ HEPES	Sigma	M2520	-
SFB	Cultilab	-	5%
PENICILINA	Sigma	P3032	50 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S1277	50 µg/mL

MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS (MIV)

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM-199 S/ HEPES	Sigma	M5017	
SFB	Cultilab	-	10%
FSH	Sigma	-	0,5 µg/mL
LH	Sigma	-	5,0 µg/mL
PENICILINA	Sigma	P3032	50 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S1277	50 µg/mL
PIRUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	0,2 mM

FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS (FIV)

Meios para preparo do sêmen

REAGENTE	TALP-SP ESTOQUE		
	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
H ₂ O	Ultra-Pura	-	-
NaCl	Gibco	-	100
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S0751	≈ 0.3
KCl	Sigma	P5405	3.1
ÁCIDO LÁTICO 98%	Sigma	L4263	0.112
HEPES	Gibco	-	10
NaHCO ₃	Sigma	S6297	25
PHENOL RED	Sigma	P5530	0.028
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C3881	2.1
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M0250	0.4
PIRUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	0.05
PENICILINA	Sigma	P3032	100 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S1277	100 µg/mL

TALP-SP USO			
REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
TALP-SP ESTOQUE	-	-	-
BSA FRAÇÃO V	Sigma	-	0.006 g/mL
PITUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	0,2 mM
PENICILINA	Sigma	P3032	100 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S1277	100 µg/mL

Meios para o gradiente de mini Percoll

TALP 10X			
REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
H ₂ O	Ultra-Pura	-	-
NaCl	Gibco	-	924
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S0751	04
NaHCO ₃	Sigma	S6297	250
KCl	-	P5405	31
ÁCIDO LÁTICO 98%	Sigma	L4263	0.27
PIRUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	10
HEPES	Sigma	H4034	100
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	S0751	15.2
PHENOL RED	Sigma	S6297	0.028
PENICILINA	Sigma	P3032	100 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S6297	100 µg/mL

PERCOLL 90%			
REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
PERCOLL	Pharmacia	17-0891-01	-
TALP 10X	-	-	-

PERCOLL 45%

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
PERCOLL 90%	-	-	-
TALP-SP USO	-	-	-

PREPARO DO GRADIENTE DE PERCOLL

REAGENTE	QUANTIDADE
	μL
PERCOLL 90%	400
PERCOLL 45%	400

MEIOS PARA FIV

TALP-FEC ESTOQUE

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
H ₂ O	Ultra-Pura	-	-
NaCl	Gibco	-	114
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S0751	0.33
NaHCO ₃	Sigma	S6297	25
KCl	Sigma	S0751	3.22
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	S0751	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C3881	2.04

ÁCIDO LÁTICO 98%	Sigma	L4263	0.01
PHENOL RED	Sigma	S6297	0.056
PIRUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	0.21
PENICILINA	Sigma	P3032	100 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S1277	100 µg/mL

TALP-FEC USO			
REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
TALP-FEC ESTOQUE			
BSA LIVRE DE ÁCIDOS GRAXOS	Sigma	A8806	0.006g/mL
PIRUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	0.21mM
PENICILINA	Sigma	P3032	100 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S1277	100 µg/mL

PHE			
REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
SOLUÇÃO SALINA 0.9%	-	-	0.9%
PENICILAMINA	Sigma	P4875	2.0 mM
HIPOTHAURINA	Sigma	H1384	1.0 mM
EPINEFRINA	Sigma	E4250	250 mM

FIV FINAL			
REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
TALP-FEC USO	-	-	-
PHE	-	-	-
HEPARINA	Sigma	-	20

MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (CIV)**Meio SOF estoque**

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO mM
NaCl	Sigma	-	107,5
KCl	Sigma	P5405	7,1
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	Sigma	S0751	24,8
KH ₂ PO ₄	Sigma		1,2
NaHCO ₃	Sigma	S6297	1,7
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	Sigma	C3881	7,0
LACTATO DE SÓDIO		-	1,5
HEPES		H4034	10,0
GLICOSE		-	0,5
VERMELHO FENOL		-	-
ÁGUA ULTRAPURA		-	-

Meio SOF uso

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
SOF ESTOQUE	-	-	-
SORO FETAL BOVINO	Nutricell	-	2,5%
BSA FRAÇÃO V	Sigma	-	0,006 g/mL
BME	Sigma	-	2%
MEM	Sigma	-	1%
PIRUVATO DE SÓDIO	Sigma	P4562	0,2 mM
PENICILINA	Sigma	P3032	100 UI/mL
ESTREPTOMICINA	Sigma	S6297	100 µg/mL