

Produção in vitro de embriões bovinos, clonagem animal e apoptose¹

Eduardo Rocha², Luiz Sergio de Almeida Camargo^{3,4}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto edição genômica em embriões bovinos via sistema CRISPR/Cas9 conjugado com nanopartículas de carbono, liderado por Luiz Sergio de Almeida Camargo.

²Graduando em Farmácia – UNICSUM/JUIZ DE FORA. e-mail: dudujf98@gmail.com

³Pesquisador Embrapa Gado de Leite. e-mail: luiz.camargo@embrapa.br

⁴Orientador

Resumo: O presente trabalho relaciona a produção in vitro de embriões (PIVE) com a clonagem, também conhecida como transferência nuclear com células somáticas (TNCS), onde etapas da PIVE são de importância para o sucesso da clonagem animal, e mostra que o sucesso de ambas as técnicas pode ser afetado pela ocorrência de apoptose. Portanto, o sucesso dessas técnicas está relacionado a qualidade dessas etapas e a eliminação de fatores estressantes que podem levar a apoptose.

Palavras-chave: Apoptose Celular, Clonagem Animal e Produção in Vitro de Embriões

In vitro embryo production, animal cloning and apoptosis

Abstract: The present work connects the in vitro embryo production (IVP) with cloning, also known as somatic cell nuclear transfer (SCNT), where steps of the IVP are of importance for the success of animal cloning, and shows that the success of both techniques can be affected by apoptosis. Therefore, the success of both techniques is related to the quality of these steps and the elimination of stressors that can lead to apoptosis.

Keywords: Cell Apoptosis, Animal Cloning and In Vitro Embryo Production (IVP).

Introdução

A tecnologia de produção in vitro de embriões (PIVE) surgiu na década de 80 e se desenvolveu nas últimas décadas, tornando-se a técnica de escolha para reprodução assistida em bovinos. A produção in vitro de embriões é conduzida em três etapas: a maturação oocitária, a fecundação dos oócitos *in vitro* e o cultivo embrionário até chegar ao estágio de blastocisto (Camargo *et al*, 2006). Neste momento os embriões estão prontos para a transferência para receptoras ou para serem criopreservados. A TNCS surgiu em 1996, com o relato do nascimento da ovelha clone Dolly (Wilmut *et al*, 1997), sendo essa técnica dependente das mesmas etapas da PIVE, com exceção da fecundação in vitro. O processo de apoptose, também conhecido como morte celular programada, ocorre regularmente para garantir um equilíbrio homeostático entre formação e a morte celular sendo, portanto, considerada crucial no desenvolvimento de um embrião ao longo do crescimento de um organismo. No entanto, um desequilíbrio dessa função pode contribuir para um crescimento/proliferação celular anormal e afetar o desenvolvimento celular e embrionário (Obeng, 2021).

O objetivo deste trabalho e revisão bibliográfica é relacionar a PIVE, a TNCS e a apoptose celular proporcionando um entendimento de como cada uma dessas se inter-relacionam e são afetadas pela apoptose na produção do embrião.

Material e Métodos

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa bibliográfica. Ressalta-se que não houve pesquisa laboratorial, por conta do estado de pandemia no Brasil, desde março de 2020, e da suspensão temporária das atividades laboratoriais. Sendo assim, esta revisão tem como base artigos retirados de plataformas como: Google Acadêmico, Periódicos Capes, Scielo e PubMed, além de livros da área

Resultados e Discussão

Produção in vitro de embriões (PIVE)

A PIVE é a técnica de reprodução assistida atualmente mais utilizada na produção de embriões bovinos. A maturação ocorre diretamente após a remoção do oócito do ambiente folicular, e ela ocorre tanto à nível citoplasmático como nuclear. As alterações nucleares ocorrem em torno de 24 horas, fazendo o oócito passar do estágio de diplóteno da prófase I até o estágio de Metáfase II (Gonçalves *et al.*, 2007). É necessário utilizar um meio adequado para que ocorra essa maturação. O meio de escolha geralmente é o *tissue culture medium* (TCM199), adicionado de nutrientes e de hormônios, como FSH e LH, além da suplementação com soro bovino e/ou albumina sérica bovina (Camargo *et al.*, 2006). Deve-se atentar que qualquer alteração morfológica no processo de aspiração folicular pode causar impacto na maturação.

Após a maturação o oócito está pronto para a fecundação. Nesta fase, é necessário utilizar um meio de cultivo apropriado, suplementado com heparina, importante na capacitação do espermatozoide, dentre outros componentes. Para a descongelamento do sêmen, geralmente se utiliza banho maria a 35°- 37°C por 30 segundos seguido de centrifugação em solução com diferentes gradientes de Percoll, para que ocorra uma separação dos espermatozoides viáveis. O período de co-incubação dos espermatozoides com os oócitos para a fertilização in vitro pode variar de 12 a 20 horas, quando então os presumíveis zigotos podem ser transferidos para o meio de cultivo (3ª etapa do processo)

No período de cultivo embrionário o embrião permanece de sete a oito dias em estufa incubadora, quando então atinge o estágio de blastocisto e estará pronto para a transferência para o útero de uma receptora ou para criopreservação. Para o cultivo embrionário está disponível diferentes meios de cultivo, sendo o mais comum o meio fluido sintético do oviduto (SOF), suplementado com soro ou albumina. O ambiente atmosférico ideal para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário deve conter 5-6% de CO₂, podendo ser em baixa tensão de O₂ (5-7%) ou em ar atmosférico (Gonçalves *et al.*, 2007).

Transferência nuclear de célula somática,

A técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS), também conhecida por clonagem animal, apesar de ter alguns avanços, ainda apresenta eficiência limitada e tem se desenvolvido lentamente (Ogura *et al.*, 2012), pois há diversas barreiras a serem vencidas, tanto biológicas quanto éticas. Resumidamente, a técnica consiste nas seguintes etapas: enucleação de um oócito, maturado de forma semelhante a PIVE; seleção de uma célula somática doadora do núcleo; injeção dessa célula doadora no espaço perivitelínico do oócito enucleado; indução da fusão entre as membranas da célula doadora e do oócito, através de um equipamento chamado eletrofusor, e finalmente na ativação do oócito reconstruído com a célula doadora (Ibtisham *et al.*, 2017).

O embrião reconstruído é cultivado *in vitro* para seu desenvolvimento até estágio de blastocisto, como ocorre na PIVE. O sucesso da TNCS depende de diversas

modificações na cromatina, replicação do DNA, ativação do genoma embrionário, reprogramação celular, modificação das histonas, reprogramação da metilação do DNA e por fim a reprogramação do transcriptoma (Rodrigues-Osorio *et al.*, 2012).

Apoptose Celular

A apoptose, também conhecida como morte celular programada pode ser induzida por algum efeito extrínseco ou intrínseco (Obeng, 2021), porém, diferentemente da necrose, na apoptose não ocorre extravasamento de conteúdo citoplasmático, não ocorrendo nenhum tipo de dano as células vizinhas. As células em apoptose podem apresentar agregação e condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda do volume celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos (Ziegler & Groscurth, 2004).

A taxa de incidência desta alteração nas células, gametas e embriões influencia diretamente o sucesso das técnicas de reprodução assistida.

Exposição dos oócitos e embriões aos meios de cultivo sub-ótimos, estresses oxidativo ou térmico, decorrentes do próprio processo de manipulação e ambiente de cultivo *in vitro*, elevam as taxas de apoptose e reduzem as chances de se obter embriões saudáveis, sejam esses produzidos pela fecundação *in vitro* ou pela clonagem animal (Khurama & Niemann, 2000).

Portanto, deve-se procurar minimizar as de estresse e controlar os fatores desencadeantes da apoptose ara o incremento das taxas e na qualidade de embriões produzidos por PIVE ou TNCS.

Conclusão

A PIVE e a TNCS compartilham de algumas técnicas de cultivo para maturação do oócito e para o desenvolvimento embrionário e que são influenciados por fatores indutores de apoptose. O sucesso de ambas está relacionado a qualidade desses cultivos e a eliminação de fatores estressantes que podem levar a apoptose, a qual reduz a qualidade embrionária.

Agradecimentos

Agradeço a meu orientador por toda a paciência e cuidado, durante minha jornada acadêmica.

Referências

- CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.; VALE FILHO, V. R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Anim. Reprod**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, H. M.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões: O estado da Arte. **Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.
- IBTISHAM, F.; FAHD QADIR, M. M.; XIAO, M.; AN, L. Animal cloning applications and issues. **Russ J Genet**, v. 53, p. 965–971, 2017. doi: <https://doi.org/10.1134/S102279541709006X>
- KHURANA, N. K.; NIEMAN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 741-756, 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00387-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00387-3)

- MATOBA. S.; ZHANG, I. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. **Cell Stem Cell**, v. 23, p. 1-15, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.018>
- OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Braz. J. Biol**, São Carlos, v. 81, n. 4, p. 1133-1143, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- OGURA. A.; INOUE, K.; WAKAYAMA, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. **Phil. Trans. R. Soc**, v. 368, n. 1609. 2012. doi: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0329>
- RODRIGUEZ-OSORIO N., URREGO R., CIBELLI JB., EILERTSEN K., MEMILI E. Reprogramming mammalian somatic cells. **Theriogenology**, v. 78, p. 1869–1886, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.030>
- SILVA, R.R., VULCANI, V.A.S., CAMARGOS, A.S., COSTA, U.R., DUTRA, M.M., CHIARI, J.R. Produção in Vitro de Embriões Bovinos: Estado da Arte. **Colloquium Agrarie**. v. 13, p. 402-415, 2017. doi: [10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244](https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244)
- WILMUT, I., SCHNIEKE, A., MCWHIR, J. ET AL. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997. doi: <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- ZIEGLER, U., GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**. v. 19, p. 124-28, 2004. doi: <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>