

CLONAGEM ANIMAL: REVISÃO DE LITERATURA

ANIMAL CLONING: LITERATURE REVIEW

Anelize De Souza Trecenti

Acadêmica da Faculdade de Medicina Veterinária de Garça

Vanessa Zappa

Docente da Faculdade de Medicina Veterinária de Garça



RESUMO

Durante muitas décadas, muitos grupos de pesquisa vem buscando conhecer aspectos fisiológicos e embrionários envolvidos na reprodução, como também obter descendentes de animais geneticamente valiosos, no entanto foram estudadas a utilização de diversas biotecnologias como ferramenta para a realização desse objetivo. E entre essas biotécnicas de ultima geração que foram desenvolvidas em especial a transferência nuclear por células somáticas (TNCS) ou clonagem. Onde o principio da técnica reúne duas etapas: a primeira que consiste em utilizar oocitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação e a segunda consiste em reconstruir o embrião e transferi-lo para uma receptora sincronizada.

Palavras- chave: biotecnologia ,clonagem, transferência nuclear por células somáticas, embriões.

ABSTRACT

For decades, many research groups have been seeking to understand the physiological aspects involved in reproduction and embryonic, but also obtain offspring from genetically valuable, however were studied using several biotechnology as a tool to achieve this goal. Among these biotechniques latest generation have been developed especially for somatic cell nuclear transfer (SCNT) or cloning. Where the principle of the technique involves two steps: the first involves using oocytes as recipient cytoplasm after enucleation process and the second is to reconstruct the embryo and transfer it to a receiver synchronized.

Keyword: biotechnology, cloning by somatic cell nuclear transfer, embryos.

INTRODUÇÃO

Clones ou cópias idênticas de indivíduos podem atualmente ser produzidos graças à evolução da biotécnica de transferência nuclear por células somáticas ou reconstrução embrionária. A produção de clones é de grande interesse não só para o melhoramento genético (produção animal) mas também para a biotecnologia, bem como para diversas áreas de pesquisa fundamental (COLLEAU,1992; TROUNSON & PERA,1998; WILMUT,1998;ZAWADA et al., 1998; CAMPBELL,1999;GURDON & COLMAN, 1999; KIKYO& WOLFFE,2000).

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 transferência nuclear 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 (BORDIGNON, 2008).

Entre várias visões de desenvolvimento das quatro gerações de biotecnologias modernas da reprodução animal, a evolução da clonagem animal pode ser comparada à de uma modalidade esportiva de resistência que poucos têm a aptidão de concluir. Considerando-se o “Espírito Olímpico” atual, o sucesso da clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS) depende da transposição de uma série de obstáculos e dificuldades técnico-biológicas que poderiam ser mais bem definidas como um teste de rusticidade ou mesmo um “pentatlo embrionário”, com a existência de pelo menos cinco etapas complexas e desafiadoras para a produção de um clone que se iniciam na reconstrução *in vitro* dos embriões e que culminam com o nascimento de um animal que sobreviva em seu final, à vida adulta. Como no pentatlo moderno, onde o vencedor é considerado o atleta mais completo, no “pentatlo embrionário” da clonagem o vencedor é o animal que apresentar o desenvolvimento mais completo que permita a conclusão do “circuito” de desenvolvimento e nascimento e sobrevivência no “circuito” pós-natal (THIBIER, 2005).

O objetivo desse trabalho foi fazer uma revisão de literatura apresentando a biotecnologia da clonagem em animais, a técnica mais utilizada, no qual é a de transferência nuclear por células somáticas (TNCS), as complicações de maior ocorrência, sendo que ainda ocorre muitos erros por ser uma técnica pouco usada e estudada, desenvolvimento embrionário muito baixo ainda nos dias de hoje.

REVISÃO DE LITERATURA

Definição

A palavra clone vem do grego “klôn” e tem por significado “broto”. Definida para representar as técnicas assexuadas de enxertia e brotamento para a multiplicação de plantas, a clonagem passou a ter outro significado com o aprimoramento das técnicas de manipulação de embriões. Em animais, a clonagem pode ser definida como a produção de indivíduos geneticamente idênticos (HEYMAN e RENARD, 1996).

Histórico e evolução

A transferência nuclear foi inicialmente proposta por Spemann em 1938, como instrumento para o estudo da equivalência nuclear, isto é, para determinar se a cromatina sofreria algum tipo de modificação durante a diferenciação nuclear. Foi necessário mais de um quarto de século para que Bruges & Kings (1952), realizarem com sucesso a primeira transferência nuclear em anfíbios. E após isso, foram muitos os estudos conduzidos para que o anfíbio se tornasse modelo animal na biotécnica. Na década de 60, Gordon & Uehlinger, 1966, possibilitaram estudos da produção de clone proveniente de células intestinais retirado de rãs no estágio de larva (BORDIGNON e SMITH, 2002).

O primeiro relato de mamíferos nascidos a partir de embriões reconstituídos foi descrito em camundongos por Illmensee e Hope (1981). A técnica envolvia o isolamento do núcleo de células da massa celular interna (MCI) e sua introdução direta no citoplasma de zigotos, que eram posteriormente enucleados. Mc Grath e Solter (1983) são considerados os pioneiros na reconstrução de embriões mamíferos utilizando o método denominado transferência nuclear (TN). Essa técnica envolve microcirurgia e fusão celular e não requer o isolamento e a injeção do núcleo no interior do citoplasma. Porém, o primeiro relato de um mamífero nascido a partir dessa técnica foi descrito somente em 1986, em ovinos, por Willadsen. Desde então, a TN vem sendo empregada com êxito em diversas outras espécies, como bovinos, ovinos, caprinos, coelhos, equinos, muares entre outros (PRATHER et al., 1987).

A possibilidade de estabelecimento e manutenção de culturas de células a serem utilizadas como fonte doadora de núcleo foi fundamental para o desenvolvimento da técnica, que resultou no nascimento da ovelha “Dolly”, o primeiro clone produzido a partir de células somáticas diferenciadas obtidas de um animal adulto. Com base nesses resultados e observações, esses autores provocaram uma das maiores revoluções da ciência contemporânea

e assim, além de responder ao questionamento de Speemann (1938), demonstraram a viabilidade da clonagem de indivíduos adultos para todo o mundo (WILMUT et al.1997).

No Brasil, foram conseguidos clones bovinos a partir de células embrionárias, fetais e adultas. Em março de 2001, em Brasília, DF nasceu o primeiro clone a partir de célula embrionária, a Vitória. No dia 27 de abril de 2002, em Monte-Mor – SP, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada jovem, o Marcolino da USP ,o qual apresentou desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais. Em julho de 2002, em Jaboticabal- SP, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada adulta, a 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 et al., 2003).

Figura 1: Vitoria da Embrapa



Figura 2: Penta de Jaboticabal



Fonte: F1:<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/ciencia/fe2203200101.htm>

F2: <http://www.unesp.br/proex/informativo/edicao14ago2002/materias/clonejaboticabal.htm>

E em 2012, nasce o primeiro clone equino no Brasil (Figura 3), o cavalo Turbante JO da raça Mangalarga Marchador ,realizado pela empresa In Vitro do Brasil na cidade de Mogi Mirim, onde o cavalo que morreu em 1998 , está inscrito no livro “Guinness” como o cavalo que produziu o maior número de filhos do mundo (1.678), e seu material genético esteve guardado durante 15 anos (NASCIMENTO, 2012)



fonte: Divulgação/In Vitro do Brasil

Os resultados recentes, obtidos com transferência nuclear retirada de animais adultos, sugerem que um número ilimitado de cópias de animais de interesse comercial ou científico possa ser obtido. Entretanto, muitas dúvidas ainda necessitam ser esclarecidas, não só para tornar a tecnologia mais eficiente como também para determinar possíveis efeitos sobre os animais gerados. Deve-se atenção especial dada para esclarecer as altas taxas de mortalidade embrionária, fetal e peri-natal, bem como para as causas da alta incidência de anomalias e baixa viabilidade dos animais clonados (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Porém, a eficiência da clonagem ainda é extremamente baixa, pois é um processo que envolve complexa combinação de fatores tanto biológicos como técnicos que interagem entre si, muitos dos quais ainda não são compreendidos (WELLS et al., 1999).

Aplicações e perspectivas atuais

A clonagem pode ser usada comercialmente em rebanhos para produzir cópias genômicas de animais de alto valor genético (GALLI et al., 1999) sendo que atualmente, a clonagem está restrita a rebanhos de elite e animais com características especiais (MEIRELLES et al., 2007). E também sendo usada na tentativa de preservação de espécies ameaçadas de extinção (LOI et al., 2001).

A clonagem terapêutica representa também outra área de pesquisa com grande potencial de aplicação da transferência nuclear. O termo “clonagem terapêutica” se refere ao

Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária é uma publicação semestral da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Garça - FAMED/FAEF e Editora FAEF, mantidas pela Associação Cultural e Educacional de Garça - ACEG. CEP:

17400-000 - Garça/SP - Tel.: (0**14) 3407-8000

www.revista.inf.br - www.editorafaef.com.br - www.fae.edu.br.

uso da transferência nuclear para produzir células ou tecidos que possam ser usados em diferentes tipos de terapias, incluindo o tratamento de doenças degenerativas, traumáticas, ou de origem genética (RHIND et al,2003).

Técnica da clonagem: transfêrencia nuclear de células somáticas

Como se trata de uma técnica relativamente complexa, com grande número de variações entre cada uma das etapas envolvidas decorrentes de diferentes metodologias empregadas pelos diversos grupos de pesquisa que tem trabalhado com a clonagem, aliado ao fato de que existam diferenças espécie-específicas, há uma ampla variação dos resultados no que diz respeito ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto (ROBL, 1999; WELLS, 1999; WESTHUSIN et al., 2001).

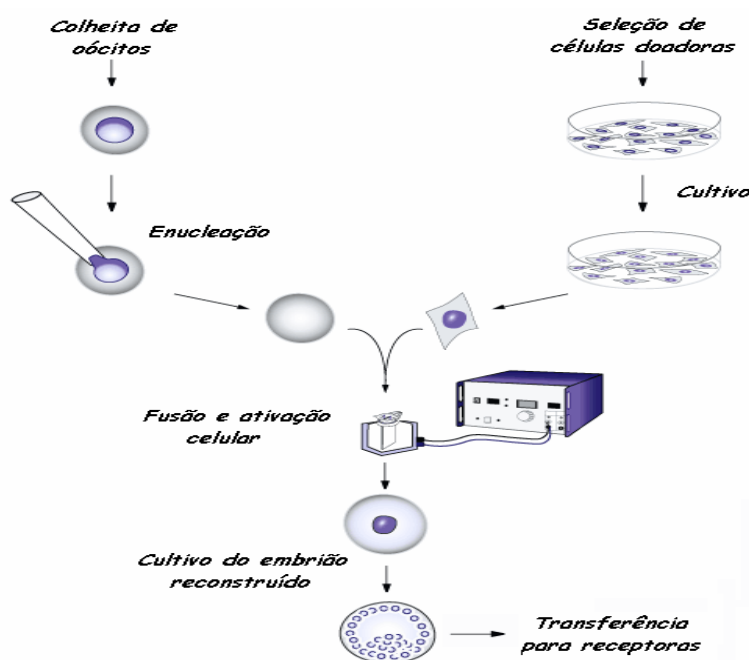


Figura 4: Apresentação esquemática dos diferentes eventos da transferência nuclear de células somáticas.

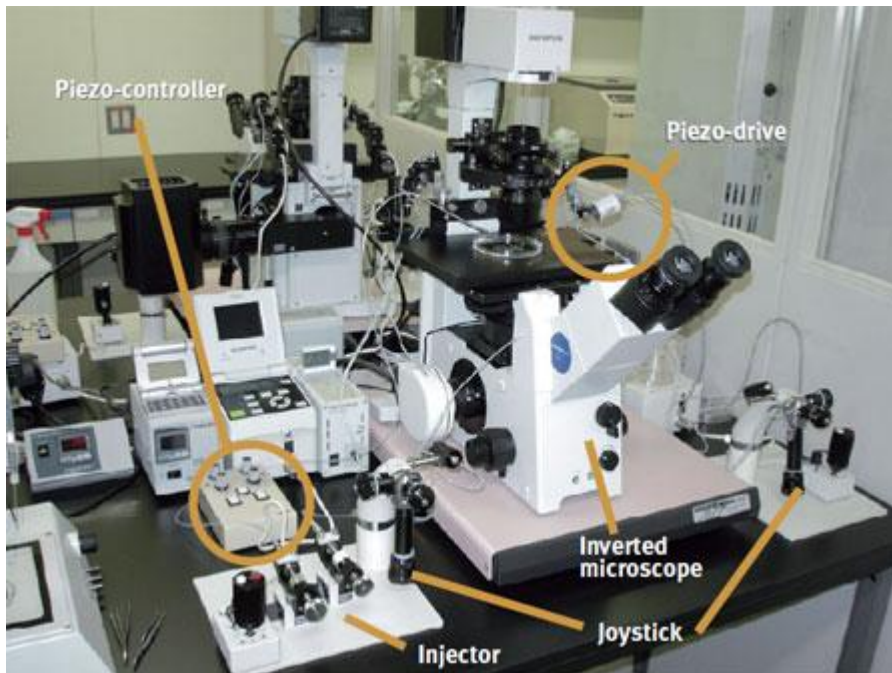


Figura 5: Micromanipulador usado para a técnica de clonagem TNCS

Fonte: <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/4726>

Obtenção e Maturação dos oócitos receptores

Os oócitos receptores representam um dos maiores componentes na produção de embriões por transferência nuclear, pois contém os fatores responsáveis pela reprogramação nuclear, onde a qualidade dos oócitos é fundamental para permitir a reprogramação dos núcleos transferidos e para suportar o período inicial do desenvolvimento embrionário. Além disso, o estágio de ciclo celular no momento da enucleação e da transferência nuclear é decisivo para garantir uma boa interação entre o citoplasma do oócito receptor e pelo núcleo transferido (BORDIGNON, 2008).

Os oócitos receptores são normalmente utilizados na fase final da maturação meiótica, quando se encontram no estágio de metáfase II (M-II). A maturação até o estágio de metáfase II pode ser feita *in vivo* e os oócitos recuperados dos ovidutos após a ovulação ou recuperados diretamente dos folículos no momento que antecede a ovulação. A maturação pode também ser feita *in vitro* onde os oócitos que se encontram no estágio de prófase I ou vesícula germinativa, são recuperados de folículos antrais e atingem estágio de metáfase II (BORDIGNON e SMITH, 2002).

As condições para a maturação são similares às aquelas para a produção *in vitro* (PIV) de embriões, ou seja, meio TCM 199 suplementado com hormônios e antibióticos, mantidos em temperatura de 38,5–39,0°C durante 16–24 h em atmosfera com umidade saturada contendo 5% de CO₂ em ar. Embora meios de maturação sejam suplementados com outros fatores como estradiol, IGF-I e cisteamina, nenhuma diferença na produção de animais saudáveis tem sido verificada (KEEFER et al., 2001; ARAT et al., 2002; KEEFER et al., 2002).

A escolha do método de maturação(*in vivo ou in vitro*) é normalmente feito em função da espécie, como no caso de animais de laboratório a maturação é preferencialmente feita *in vivo*, pelo fato de que a recuperação dos oócitos é feita após sacrifício. E em casos de bovinos a maioria das vezes é feita *in vitro*, mesmo que os primeiros estudos tenham sido feitos *in vivo* onde apresentavam vantagens de que os oócitos adquiriam um maior potencial para suportar o desenvolvimento em relação aos maturados *in vitro*. Mas por outro lado, os custos relacionados com a superovulação e a colheita dos oócitos em animais de produção, limitam a produção de um grande número de oócitos para fins de clonagem (BORDIGNON e SMITH, 2002).

Seleção e preparação das células doadoras de núcleo

A origem do núcleo doador utilizado para transferência nuclear pode ter efeitos importantes sobre a capacidade de desenvolvimento de embriões reconstruídos até o estágio de blastocisto, bem como sobre o desenvolvimento fetal pós-implantação. Com a obtenção do primeiro mamífero a partir de células embrionárias em cultivo (WILLADSEN *et al.*, 1986) e de linhagens fetais e adultas (WILMUT *et al.*, 1997), numerosas pesquisas foram desenvolvidas evidenciando que células somáticas de diferentes tecidos e idades podem ser utilizadas com sucesso em programas de transferência nuclear. Estudos indicam que diferentes células doadoras podem ser reprogramadas. Contudo, o modelo celular mais utilizado continua sendo o de fibroblastos obtidos de biópsias de feto ou de animais adultos, da pele ou do músculo (CHESNÉ, 2006).

Atualmente, na clonagem somática, tem-se utilizado como fonte doadora de núcleo, células obtidas de vários tecidos e de animais de várias idades (fetos, recém-nascidos, jovens, idosos e até mesmo de animais mortos após um período relativamente curto) (OBACK & WELLS, 2002)

Tabela 1. Produção de ruminantes pela técnica de transferência nuclear usando diferentes células somáticas.

Espécie	Idade do animal doador	Tipo celular	Referência
Ovinos	Feto	Fibroblasto	Wilmur et al., 1997
Wilmur et al., 1997	Adulto		Fibroblasto
Bovinos		Feto	Fibroblasto
Cibelli et al., 1998	Adulto		Epitélio ovidutário
Kato et al., 1998		Feto	Fibroblasto
Caprinos	Adulto		Fibroblasto
Baguisi et al., 1999			
Lan et al., 2006			
-			

Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2005.

As células podem ser usadas diretamente após a coleta do animal doador (GALLI et al., 1999) ou seguido de um período de cultivo celular, bem como frescas ou após criopreservação (WILMUT et al., 1997; KUBOTA et al., 2000).

2.4.3. Coordenação do ciclo celular da célula doadora de núcleo e de citoplasma receptor

A sincronização do ciclo celular entre o núcleo da célula doadora com o citoplasto do oócito receptor é importante para assegurar que seja mantida a correta ploidia após a reconstrução. Esses conceitos são baseados no efeito que o Fator Promotor de Maturação (MPF) teria sobre o núcleo. O MPF é um complexo protéico composto por duas subunidades catalíticas (proteína cinase p34^{cdc2}, regulada por eventos de fosforilação e desfosforilação de seus sítios catalíticos, e a ciclina B₁, subunidade regulatória), e na sua forma ativa, regula o processo de duplicação e divisão celular, numa cascata de eventos (quebra do envelope nuclear, condensação dos cromossomos, reorganização do citoesqueleto e alterações na morfologia da célula) que permite que a célula entre em mitose ou meiose (NURSE, 1990, MASUI, 1992).

Uma complexa série de processos nucleares e citoplasmáticos ocorre durante o ciclo celular, exigindo perfeita coordenação entre eles. O ciclo celular é subdividido nas fases Grupo 1 (G₁), síntese (S), grupo 2 (G₂) e mitose (M), sendo que a replicação do DNA nuclear ocupa somente uma parte da intérfase, chamada fase S do ciclo celular. O intervalo entre o término da mitose e o início da síntese de DNA é chamado de fase G₁, enquanto o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é chamado de fase G₂. As fases G₁ e G₂ propiciam tempo adicional para o crescimento celular, e células em G₁, ainda não comprometidas com a replicação de DNA, podem interromper seu crescimento durante o ciclo e passar para um estado especializado de repouso, chamado de G₀, no qual podem permanecer por dias, semanas ou mesmo anos antes de retornar a proliferar (ALBERTS et al., 2002).

Na clonagem somática por injeção nuclear intracitoplasmática, a introdução do núcleo em fase G₀ ou G₁ diretamente no interior de oócitos enucleados em metáfase II promove uma exposição prolongada do núcleo a um citoplasma com altos níveis do MPF, com imediata quebra do envelope nuclear e prematura condensação cromossômica, o que pode facilitar as modificações nucleares essenciais para reprogramação e desenvolvimento (WAKAYAMA et al., 1998).

Enucleação

O princípio básico da técnica consiste em promover a digestão da zona pelúcida de oócitos maturados, para, em seguida, com o auxílio de microlâminas, realizar-se a enucleação



manual. As interações citoplastos e núcleos doadores ocorrem pela exposição de tais componentes celulares à fitohemaglutinina (VAJTA, 2007). A aplicabilidade deste método já pode ser verificada em diferentes espécies pela produção de embriões clones, tais como a bovina (VAJTA et al., 2003) e ovina (PEURA, 2003).

Tabela 2. Momento da enucleação de citoplastos receptores para reconstrução embrionária em diferentes espécies de ruminantes.

Estádio nuclear	Espécie	Referência
Anáfase-telófase I	Ovinos	Campbell et al. (1996); Wilmut et al. (1997)
Metáfase II	Bovinos	Kato et al. (2000); Do et al. (2001)
Metáfase II	Camelídeos	Sansinena et al. (2003)
Telófase II	Bovinos	Bordignon e Smith (1998)
Telófase II	Caprinos	Baguisi et al. (1999)
Embrião pró-nuclear	Bovinos	Prather e First (1990)
Embrião duas células	Ovinos	Wells et al. (1997)

Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2005.

No procedimento convencional, a enucleação é realizada por microcirurgia utilizando-se oócitos em estágio de metáfase II, com aspiração, para o interior de uma micropipeta, do primeiro corpúsculo polar (CP) e de parte adjacente do citoplasma do oócito. Em camundongos e ratos, os cromossomos em MII são visíveis em microscópio óptico como uma área translúcida (FULKA et al., 2004).

Desse modo, a maioria dos protocolos utiliza o corante específico de DNA, Fluorocromo Hoechst 33342, o qual sob excitação à luz ultravioleta (UV), permite a visualização da cromatina e a confirmação da enucleação. Entretanto, a exposição à UV pode provocar danos aos oócitos e à membrana plasmática (SMITH, 1993), além de ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário (PRATHER et al., 1987).

Outro método que tem sido considerado eficiente no preparo de citoplastos para a TN em bovinos é a enucleação em telófase. Onde a técnica consiste na ativação partenogenética

de oócitos maduros e remoção do 2º Corpúsculo Polar junto com pequena quantidade de citoplasma ao redor, por meio de micromanipulação (BORDIGNON e SMITH, 1998; MOHAMED NOUR e TAKAHASHI, 1999)

Mais uma técnica de enucleação extremamente interessante é a técnica de enucleação induzida quimicamente de oócitos pré-ativados, que visa à extrusão de todo o material nuclear juntamente ao 2º CP, e que já foi descrita em murinos, coelhos, ovinos, caprinos e bovinos. Quando compara-se a enucleação não-invasiva de oócitos em Metáfase I ou Metáfase II há uma marcante diferença. Enquanto no primeiro caso, o Corpúsculo polar com todo o conteúdo nuclear é completamente liberado do oócito, no segundo caso o contato entre o 2º Corpúsculo polar e o citoplasma do oócito persiste, fornecendo dessa maneira, enucleação somente temporária (FULKA et al., 2004).

Outra técnica de enucleação utilizada é a enucleação química, sendo um procedimento muito atrativo por causar mínima diminuição do volume citoplasmático e do conteúdo proteico e molecular, além de fatores associados ao fuso, que são essenciais para o adequado desenvolvimento embrionário (FISCHER RUSSEL et al., 2005).

Reconstrução dos embriões (fusão da célula doadora/oócito receptor)

Os principais métodos utilizados para a realização da reconstrução dos embriões para a transferência nuclear são a microinjeção e a fusão entre as membranas plasmáticas da célula doadora e oócito receptor. A fusão celular pode ser induzida por diversos métodos, incluído impulsos elétricos (eletrofusão ou eletroporação), lipossomos (vesículas lipídicas), polietilenoglicol e vírus Sendai inativo. Dentre esses a eletrofusão é preferida para a maioria das espécies (BORDIGNON, 2008).

Para a reconstrução do embrião após a TNCS, o núcleo de célula doadora (carioplasto) é transferido para o interior de um citoplasma receptor (citoplasto). Cada célula doadora isolada individualmente com base no cultivo prévio é inserida no espaço perivitelino de um oócito enucleado para posterior estimulação com um pulso elétrico, o qual promove a fusão das membranas adjacentes. O pulso elétrico não somente induz a fusão da célula somática com o oócito enucleado para formar um novo complexo, mas também promove uma importante liberação de cálcio intracelular que inicia o processo de ativação (HEYMAN, 2005).



Os parâmetros usados para a eletrofusão, incluindo a duração, a intensidade e o número de pulsos, podem variar de acordo com a espécie, o tipo de equipamento e o tipo de célula a ser fundida. Compreendendo de pulso de 2 correntes. A Alternada que serve para alinhar as membranas a serem fundidas em posição paralela aos eletrodos, e é aplicada com uma frequência de 600 a 1000 kHz, voltagem de 5 a 6 V com duração de 5 a 10 μ s (microsegundos). E a direta, que induz a formação dos poros nas membranas, o que leva a fusão entre as células e é aplicada em três pulsos com intensidade de 0,6 a 3,6 kV/cm com duração de 30 a 250 μ s (microsegundos). No entanto o estreito contato entre a célula doadora e o oócito receptor e o perfeito alinhamento paralelo aos eletrodos são condições indispensáveis para bons resultados de fusão celular (BORDIGNON, 2008).

Segundo Mcgrath e Solter (1984), o vírus Sendai inativado tem sido empregado com muito sucesso em camundongos. E a sua metodologia consiste em injetar no espaço perivitelino, juntamente com a célula doadora, uma fração de meio contendo o vírus inativado. Uma diferença em relação com a eletrofusão é que o vírus induz a fusão sem causar ativação dos oócitos receptores, o que pode ser de interesse em algumas situações experimentais. E além de permitir a reconstrução dos embriões sem interferir no ciclo celular dos oócitos receptores, evita a transferência do citoplasma da célula doadora para dentro do oócito, o que facilita as interações entre o núcleo transferido e o citoplasma receptor favorecendo a reprogramação nuclear.

Em ruminantes, a reconstrução embrionária é geralmente alcançada por eletrofusão, mas esta etapa pode também ser obtida pela injeção intracitoplasmática da célula intacta ou do núcleo isolado. Após a fusão, os embriões reconstruídos por TNCS são submetidos à ativação artificial, a qual deve mimetizar o papel exercido pelos espermatozoides durante a fecundação. Na maioria dos mamíferos os oócitos em MII após a ovulação são fecundados. Durante a maturação oocitária ocorrem uma reorganização e redistribuição específicas de organelas citoplasmáticas, e os oócitos obtêm um complemento de moléculas sinalizadoras (MIYAZAKI *et al.*, 1993).

Ativação dos oócitos receptores

A ativação consiste na etapa chave do processo de TNCS e pode ser obtida física e/ou quimicamente, por métodos que podem ou não estar diretamente ligados aos níveis de cálcio

intracelular. Quanto aos meios físicos, pode ser citada a injeção de cálcio diretamente no citoplasma, promovendo em seguida estímulos elétricos que promoverão a liberação de concentrações intracelulares de cálcio. Os oócitos também podem ser ativados quimicamente por meio da utilização de cálcio ionóforo, A23187 (CIBELLI *et al.*, 1998), ionomicina (HILL *et al.*, 2001), cicloheximida (KEEFER *et al.*, 2002) ou 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (SUSKO-PARRISH *et al.*, 1994). Em ruminantes, o uso de cálcio ionóforo seguido por um tratamento com inibidores da atividade de proteínas quinases, tal como a 6-DMAP ou por inibidores de proteínas quinases dependentes de ciclinas por três a seis horas, são os tratamentos mais realizados (KEEFER *et al.*, 2002; SANSINENA *et al.*, 2003).

Fisiologicamente, no caso da fecundação, o espermatozoide ao penetrar no óvulo, induz a degradação do MPF (Fator promotor de maturação) desencadeando assim o fim da meiose e início do desenvolvimento embrionário. No entanto artificialmente a ativação dos oócitos se baseia na indução de oscilações de cálcio (SWAN & OZIL, 1994).

Diversos agentes de ativação têm sido empregados na clonagem, sendo os principais:

Pulsos elétricos de corrente direta de alta voltagem e curta duração: que promovem aumento do Ca^+ intracelular através da abertura temporária de poros na membrana plasmática do oócito, permitindo trocas de íons e macromoléculas, com entrada de Ca^+ extracelular (ZIMMERMANN & VIENKEN, 1982);

Ionomicina: que aumentam o influxo de Ca^+ do meio extracelular bem como mobiliza Ca^+ dos estoques citoplasmáticos intracelulares (KLINE & KLINE, 1992; NAKADA & MIZUNO, 1998);

Etanol (7%): promovem uma rápida potencialização da liberação de Ca^+ mediado pela estimulação da formação de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3) na membrana plasmática (ILYIN & PARKER, 1992). No entanto, a exposição a soluções diluídas de etanol podem promover danos ao citoesqueleto com aumento da taxa de aneuploidia em partenotos (KAUFMAN, 1982; O'NEILL & KAUFMAN, 1989);

Injeção intracelular de CaCl_2 no citoplasma: induz a exocitose de grânulos corticais e declínio da atividade da histona quinase H1 (MACHATY *et al.*, 1996);

Cicloheximide e Puromicina: inibidores de síntese protéica que atuam em conjunto (ativação combinada) no processo de ativação do oócito prevenindo a produção da ciclina B_1 ,

componente do MPF, fazendo com que este permaneça inativo (PRESICE & YANG, 1994; NUSSBAUM & PRATHER, 1995; TANAKA & KANAGAWA, 1997);

6-Dimetilaminopurina (6-DMAP): inibidor de fosforilação de proteínas ou inibidores de enzimas cinase. Onde a manutenção dos oocitos por algumas horas evita que a atividade do MPF seja restabelecida e bloqueie o desenvolvimento embrionário (BORDGNON, 2008)

Estrôncio: onde induz repetitivos aumentos da concentração de Ca^{+} livre intracelular (KLINE & KLINE, 1992) de modo semelhante ao que ocorre na ativação dos oócitos após a fertilização (BOS-MIKICH et al., 1997). Mostrou ser viável na clonagem em bovinos (YAMAZAKI et al., 2005). Sendo usado também rotineiramente em camundongos.

Cultivo e transferência de embriões reconstituídos para fêmeas receptoras

Após a fusão e a ativação, os embriões reconstruídos são cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto, utilizando uma variedade de sistemas de cultivo rotineiramente usados na produção *in vitro* (PIV) de embriões, dentre os quais podem ser citados sistemas de cocultivo utilizando células primárias do oviduto ou linhagens celulares estabelecidas (THOMPSON, 2000).

Em geral, o cultivo *in vitro* requer uma suplementação de componentes os quais podem auxiliar no desenvolvimento, mas que, por um período longo de exposição, podem alterar negativamente a qualidade do embrião. Dentre estes componentes podem ser citados: soro fetal bovino, soro de cabra/ovelha em estro, albumina sérica bovina (BSA), fatores de crescimentos e vitaminas, entre outros (KEEFER *et al.*, 2002; TIBARY *et al.*, 2005).

Salamone et al. (2003), trabalhando com transferência nuclear na espécie bovina, verificaram que embriões cultivados em meio SOF na ausência de cocultivo, porém numa atmosfera de três gases (5% de O_2 , 5% de CO_2 , 90% de N_2), apresentaram melhores taxas de clivagem e formação de blastocistos quando comparados àqueles tratados em sistemas de cocultivo. Adicionalmente, estudos realizados por Chesné et al. (2003) sugerem que as condições ótimas para o cultivo de embriões bovinos e caprinos consistem em meio B2-INRA-Menezo co-cultivado com células do oviduto.

Em ruminantes, os procedimentos de transferência de embriões podem ser cirúrgicos, semi-cirúrgicos ou não cirúrgicos. O método cirúrgico ou laparotomia consiste em exteriorizar o corno uterino e depositar os embriões próximos à junção útero-tubárica

(BAGUISI et al., 1999; KEEFER et al., 2001). Embriões caprinos cultivados por 35 h até o estágio de quatro células são transferidos cirurgicamente para o interior do oviduto com uma média de cinco embriões por receptora (CHESNÉ et al., 2003). O método semi-cirúrgico ou semi-laparoscópico é usualmente realizado em caprinos e ovinos (CHESNÉ et al., 2003; BARIL, 2006).

Em geral, a técnica consiste em associar a laparoscopia a uma pequena incisão sem a necessidade de expor o animal a uma anestesia geral. Finalmente, o método não cirúrgico, frequentemente realizado em bovinos, consiste em inserir, por via transcervical, embriões no corno uterino ipsilateral ao ovário, apresentando pelo menos um corpo lúteo (CIBELLI et al., 1998; CHAVETTE-PALMER et al., 2002).

Esta etapa de transferência do embrião, depende muito de fatores extrínsecos e ambientais, como a necessidade do domínio técnico dos processos biológicos e reprodutivos que envolvem a seleção de fêmeas receptoras, a manipulação dos ciclos estrais, e de habilidades técnicas específicas, como a transferência de embrião (TE) propriamente dita, normalmente realizada no Dia 7 de desenvolvimento, após cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões. Porém, dominados os fatores técnico-biológicos acima, o sucesso nesta etapa depende por sua vez de aspectos intrínsecos dos embriões clonados, relacionados à viabilidade dos embriões transferidos. O sucesso nesta etapa, entretanto, está relacionado não somente ao estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica embrionária, mas fundamentalmente ao padrão de reprogramação nuclear obtido após a reconstrução pela clonagem que seja permissiva de uma expressão temporal e/ou espacial de genes importantes para os eventos biológicos associados ao desenvolvimento na fase embrionária pré-implantacional (LI et al., 2005; ARNOLD et al., 2006; YANG et al., 2005, 2007).

Complicações da clonagem

Embora animais de diferentes espécies tenham sido clonadas a partir de células somáticas em diversos laboratórios pelo mundo, o êxito na produção de clones por transferência nuclear continua bastante baixo. Além disso, grandes variações nos resultados acontecem frequentemente, apesar do uso das mesmas condições de clonagem, incluindo o tipo de célula, a ativação e o cultivo dos embriões. A baixa eficiência e a grande variação nos resultados decorrem dos diversos problemas que afetam os embriões produzidos por



transferência nuclear, desde o estágio de pré implantação até o desenvolvimento pós natal dos animais clonados (LAGUTINA et. al, 2005)

Patologias associadas a técnica

Diversas anomalias têm sido constatadas durante a gestação e após o nascimento de animais produzidos pela técnica de TNCS. A baixa eficiência e o desenvolvimento anormal de animais são principalmente em virtude da reprogramação incompleta e da expressão gênica anormal. Dentre as principais anomalias, verificam-se: cardiopatias, placentação anormal, hidroalantóide, deficiência imunológica, disfunção renal, alterações no metabolismo energético e hipertensão pulmonar (YOUNG *et al.*, 1998; HEYMAN, 2005; CAMPBELL *et al.*, 2007).

Mortalidade embrionária

As taxas de mortalidade embrionária têm sido observadas em estádios iniciais e finais da gestação. Nas perdas em fase inicial, ocorrem devido a absorção embrionária, observando-se apenas o retorno ao estro após diagnóstico de gestação. Perdas mais tardias estão associadas ao aparecimento de corrimentos vaginais com sangue e presença de membranas fetais e/ou o feto em diferentes estádios de putrefação (BORDIGNON e SMITH, 2002).

Segundo Wells (1999), a causa das perdas estão associadas a um desenvolvimento anormal da placenta, possivelmente devido ao crescimento inapropriado da placentários e pela alta mortalidade embrionária, fetal e perinatal. Esses problemas, e ocorrem porque núcleos de células diferenciadas não são corretamente reconduzidos ao estágio embrionário nos embriões membrana alantoide em decorrência da falta de vascularização nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Perdas fetais em estádios avançados são consequência da disfunção placentária que leva a formação de hidroalantoide e o aparecimento de placentomas maiores e em menor quantidade, aumento na espessura do cordão umbilical e membranas placentárias edematosas (KRUIP & DEN DAAS, 1997).

Problemas na saúde do neonatal



O aumento de peso ao nascer é uma característica bastante comum em ruminantes oriundos da clonagem, tanto que o fenômeno tem sido referido como síndrome do bezerro grande LCS (do inglês Large calf syndrome). Não se sabe ainda se o LCS é um problema com origem na clonagem , pois ele também ocorre em animais oriundos de fecundação *in vitro*, o que sugere que seja devido ao sistema de cultivo oocitário ou embrionário (WILSON et al., 1995)

Problemas respiratório tem sido relatados com muita frequência em bezerros e cordeiros clonados, o que sugere possíveis problemas na formação e funcionamento da glândula adrenal, baixos níveis de cortisol fetal e insuficiência de surfactantes pulmonares (BORDIGNON e SMITH, 2002).

Segundo Renard et al.(1999), as infecções constantes e de diversas ordens sugerem que animais clonados possuem uma deficiência imunológica, conforme observado em alguns animais que apresentam contagens de hemácias e leucócitos reduzidos. Constatações em bezerros oriundos de clonagem a partir de células fetais evidenciaram como principais problemas:

- 1)anomalias umbilicais com infecção e uracus persistentes;
- 2)pouca tolerância ao estresse e a anestesia;
- 3)broncopneumonia;
- 4) e em um caso , morte antes do nascimento com sintomas de edema generalizado e ascite (anasarca).

Desenvolvimento das crias nascidas

Em geral, a ocorrência da mortalidade pós-natal é observada da 1ª semana ao 4º mês de vida do animal. Nesse período uma grande variedade de problemas tem sido relatada em clones, incluindo infecções, tais como inflamações do rúmen e abomaso (WELLS et al., 1998), coccidiose e infecções após traumas (HEYMAN et al., 2002). A proporção de bezerros clones nascidos que são viáveis ao desenvolvimento normal até a fase adulta é limitada aos 50-70%, de acordo com vários grupos de pesquisas. Chavatte-Palmer et al. (2002) verificaram que, de 59 bezerros clones nascidos, 62% destes desenvolveram-se normalmente até a fase adulta.



As características reprodutivas de novilhas clonadas de células somáticas adultas foram avaliadas quanto à puberdade, dinâmica folicular e perfil hormonal, não sendo observada nenhuma alteração quando da comparação com o grupo controle de animais não clonados (ENRIGHT et al., 2002). Lanza et al. (2001) demonstraram que novilhas clonadas são férteis, quer seja usando a monta natural ou inseminação artificial. Usando a técnica de inseminação artificial, estes autores obtiveram uma taxa de concepção de 83% após a primeira inseminação. Adicionalmente, clones bovinos foram avaliados quanto à libido e à produção quali-quantitativa de sêmen, não sendo verificado nenhum efeito negativo sobre tais parâmetros (HEYMAN et al., 2004).

Dificuldades no parto também são relatados na clonagem, e estariam relacionadas a distúrbios endocrinológicos com diminuição das concentrações plasmáticas de cortisol, que seria insuficiente para desencadear o sistema IGF ligado à sinalização para o indução da parturição (MATSUZAKI & SHIGA, 2002). A administração de corticosteróides pode aumentar as chances de sobrevivência, induzindo o parto ou preparando-o para cesareana, bem como pode ser importante na maturação pulmonar dos clones (WELLS et al., 1999; PTAK et al., 2002).

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 freqüentes problemas clonados (reprogramação nuclear), o que provocaria a expressão errônea de genes que são necessários para sustentar o desenvolvimento normal (BORDIGNON e SMITH, 2002).

Considerações finais

A produção de clones por transferência nuclear requer uma série de etapas complexas e bastante delicadas. No entanto os resultados significativos têm sido alcançados, incluindo a clonagem de diferentes espécies, a clonagem de animais em vias de extinção, na produção de animais transgênicos e na clonagem terapêutica. Mesmo que a baixa eficiência continue limitando um maior uso de clonagem por transferência nuclear na produção animal, e as possibilidades para a aplicação dessa tecnologia em outras áreas estão sendo bastante promissoras.



Desta forma, o sucesso na clonagem também depende dos mais aptos e completos em termos técnicos. Porém, a eficiência geral da clonagem por TNCS ainda permanece baixa demonstrando, que o “normal” ainda é o insucesso .

Assim, os “mais aptos e completos” ainda têm muito a evoluir biológica e tecnicamente para atingirem pelo menos a “tendência” de serem considerados eficientes.

4. REFERÊNCIAS

ARNOLD, D.R.; BORDIGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B.D.; SMITH, L.C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*, v.132, p.279-290, 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J., RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Molecular biology of the cell*. 4. ed., New York: Garland Science, 1493p. 2002.

ARAT S, GIBBONS J, RZUCIDLO SJ, RESPESS, DS, TUMLIN M, STICE, SL. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod*, v.66, p.1768-1774, 2002.

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.



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

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

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. **IN:** GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotechnologias aplicadas à reprodução*, v.1.p281-302.ed. Roca, São Paulo, 2002

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 49, 29-36, 1998.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAN, D.G.; JONES, K.T. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. *Development*, p.172-179, 1997.

22

BARIL G. Seleção e criopreservação de embriões caprinos e ovinos. *In:* Freitas VJF (Ed.). *Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, p.21- 29, 2006.

CAMPBELL, K.H.S. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J. Anat.*, Hoboken, v.200, p.267-275, 2002.

CAMPBELL, K.H.S.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.D.W.; LEE, J.H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. *Reproduction in Domestic Animal*, 40, 256-268, 2005.

CAMPBELL, K.H.S.; FISHER, P.; CHEN, W.C.; CHOI, I.; KELLY, R.D.W.; LEE, J.H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 68, 214-231, 2007.

CAMPBELL, K.H.S. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*, v.1, p.3-15, 1999.

COLLEAU, J.J. Combining use of embryo sexing and cloning within mixed MOETs for selection on dairy cattle. *Genet. Sel. Ev.*, v.24, p.345-361, 1992.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONDE DE LEON, A.; ROBL, J. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, 280, 1256-1258, 1998.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Clinical, hormonal and hematological characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biology of Reproduction*, 66, 1596-1603, 2002.

CHESNÉ, P. Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: FREITAS, V.J.F. (Ed). *Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, p.21-29, 2006.

ENRIGHT, B.; TANEJA, M.; SCHREIBER, D.; RIESEN, D.; TIAN, X.V.; FORTUNE, J.E.; YANG, X. Reproduction characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, 66, 291-296, 2002.

FISCHER RUSSEL, D. F.; IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTROM, E. W. Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro*, *Mol. Reprod. Dev.*, New York, v.72, p.161-170, 2005.



FULKA, J.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v.22, p.279-283, 2004.

GALLI, C.; DUCHI, R.; MOOR, R.M.; Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*, 1, 161-170, 1999.

GURDON, J.B., COLMAN, A. The future of cloning. *Nature* .v.402,p. 743-746, 1999.

HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAZZARI, G.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIGNON, X. Zootechnical performance of cloned cattle and offsprings: preliminary results. *Cloning and Stem Cells*, 6, 111-120, 2004.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Frequency and occurrence of late gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction*, 66, 6-13, 2002.

HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Cloning of domestic species. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.42, p.427-436, 1996.

ILYIN, V.; PARKER, I. Effects of alcohols on responses evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, Cambridge, v.448, p.339-354, 1992.

KEEFER, C.L.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BHATIA, B.; BEGIN, I.; BILODEAU, A.S.; ZHOU, F.J.; KAFIDI, N.; WANG, B.; BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, 66, 199-203, 2002.

KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; KEYSTON, R.; WANG, B.; BHATIA, B.; BILODEAU, A.S.; ZHOU, J.F.; LEDUC, M.; DOWENEY, B.R.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer



with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, 64, 849-856, 2001.

KLINE, D.; KLINE, J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.*, San Diego, v.149,p.80-89, 1992.

KRUIP, T. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, Stoneham, v.47, p.43-52, 1997.

KIKYO, N., WOLFFE, A.P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, transfer and heterokaryons. *J.Cell Sci.*, v.113, p 11-20, 2000.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97, 990-995, 2000.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.;PONDERATO,N. TURINI, P.; CROTTI, G.; GALLI, C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology embryo reconstruction method and donor cell type. **Reproduction** , v.130,p.559-567, 2005.

LANZA, R.P.; CIBELLI, J.B.; FABER, D.; SWEENEY, R.W.; HENDERSON, B.; NAVALA, W.; WEST, M.D.; WETTSTEIN, P.J. Cloned cattle can be normal and healthy. *Science*, 294, 1893-1894, 2001.

LI, G-P.; LIU, Y.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L.; ASTON, K. I. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol. Reprod. Dev.*, New York, v.71, p.220-226, 2005.



LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULKA Jr, J.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, New York, v.19, p.962-964, 2001.

MATSUZAKI ,M.; SHIGA, K. Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells*, New York, v.4, p.261-267, 2002.

MASUI, Y. Towards understanding control of the division cycle in animal cells. *Biochem. Cell Biol.*, Ottawa, v.70, p.920-945, 1992.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microcirurgy and cell fusion. *Science*, Washington, v.220, p.1300-1302, 1983.

MELLO, M. R. B.; CAETANO, H. V. A.; MARQUES, M. G. et al. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, n. 11, p. 1485- 1489, 2003.

MEIRELLES, F.V.; PROVIDELO, F.D.; PERECIN, F.; MERIGHE, G.K.F.; FERREIRA, C.R.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; MIRANDA, M.S.; CHIARATTI, M.R.; de BEM, T.H.C. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.31, p.382-390, 2007.

MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKADA, K.; HONDA, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Developmental Biology*, 158, 62-78, 1993.

MOHAMED NOUR, M. S.; TAKAHASHI, Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, Stoneham, v. 51, p. 661-666, 1999.



NAKADA, K.; MIZUNO, J. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology*, Stoneham, v.50, p.269-282, 1998.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, London, v.344, p.503-508, 1990.

NUSSBAUM, D.J.; PRATHER, R.S. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.*, New York, v.41, p.70-75, 1995.

OBACK, B.; WELLS, D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning Stem Cells*, Larchmont New York v.4, p.147-168, 2002.

O'NEILL, G.T.; KAUFMAN, M.H. Cytogenetic analysis of ethanol induced parthenogenesis. *J. Exp. Zool.*, New York, v.249, p.182-192, 1989.

PEURA TT. Improved in vitro development rates of sheep somatic nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning method. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.13-24, 2003.

PRATHER, R.S.; BARNES, F.L.; SIMS, M.M.; ROBL, J.M.; EYSTONE, W.H.; FIST, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction*, 37, 859-866, 1987.

PRESICCE, G.A.; YANG, X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.*, New York, v.38, p.380-385, 1994.

PTAK, G.; CLINTON, M.; TISCHNER, M. Improving delivery and offspring viability of invitro-produced and cloned sheep embryos. *Biol. Reprod.*, Champaign, v.67, p.1719-1725, 2002.

RENARD, J.P.; CHASTANT, S.; CHESNÉ, P.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.;



CORDONNIER, N.; CHAVATTE, P.; VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somaticcloning. *Lancet*, London, v.353, p.1489-1491, 1999.

RHIND,S.M.; TAYLOR,J.E.;DE SOUSA,P.A.;KING,T.J.;MCGARRY,M.; WILMUT,I. Human cloning: can it be made safe?. *Nat. Genet.*, v.4, p.855-864,2003.

ROBL, J.M. Development and application of technology for large scale cloning of cattle. *Theriogenology*, Stoneham, v.51, p.499-508, 1999.

SALAMONE, D.F.; SANTOS, C.B.; BARANÃO, J.L.; BUSSMANN, L.; ARTUSO, J.; VALDEZ, A.; MUNAR, C.; WERNING, C.; MELO, C. Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. *Theriogenology*, 59, 285, 2003.

SANSINENA, M.J.; TAYLOR, S.A.; TAYLOR, P.J.; DENNISTON, R.S.; GODKE, R.A. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from in vitro matured llama oocytes. *Cloning and Stem Cells*, 5, 191-198, 2003.

SMITH, L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, Cambridge, v.99, p.39-44, 1993.

SWANN, K., OZIL,J-P.Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. **Int. Rev. Cytol.**, v.152, p.183-222, 1994.

SUSKO-PARRISH, J.L.; LLEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NORTHEY, D.L.; SCHUETZKUS, V.; FIRST, N.L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium completion. *Developmental Biology*, 16, 729-739, 1994.

TANAKA, H; KANAGAWA, H. Influence of combined activation treatments on the



success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.49, p.113-123, 1997.

THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reproduction Nutrition Development* v.45, p.235–242, 2005.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos-a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 60/61, 263-275, 2000.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, 64, 618-638, 2005.

TROUNSON, A., PERA, M. Potential benefits of cell cloning for human medicine. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.121-125, 1998.

VAJTA G. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer. *Trends Biotechnol.*, v.25, p.250-253, 2007.

VAJTA G, LEWIS IM, TROUNSON AO, PURUO S, MADDOX-HYTTLEL P, SCHIMINDT M, PEDERSEN HG, GREVE T, CALLESEN H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biol Reprod.*, v.68, p.571-578, 2003.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K.R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with *cumulus* cell nuclei. *Nature*, 394, 369-374, 1998.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; DAY, T.A.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 60, 996-1005, 1999.



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

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

WILMUT, I. Cloning for medicine. *Sci. Am.*, v.279, p.58-63, 1998.

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.

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; McCALLA, D. F. Comparison of birthweight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.38, p.73-83, 1995.

YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; MEIRELLES, F. V. GARCIA, J. M. Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic nuclear transfer. *Zygote*, Cambridge, v.13, p.295-302, 2005.

YOUNG LE, SINCLAIR KD, WILMUT I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, v.3, p.155-263, 1998.

YANG, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; KUBOTA, C.; O'NEILL, M.; HOAGLAND, T.; RENARD, J.P.; TANEJA, M.; YANG, X.; TIAN, X.C. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Molecular Reproduction and Development*, v.71, n.4, p. 431-438, 2005.

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



ZAWADA, W.M., CIBELLI, J.B., CHOI,P.K., et al. Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. Nat.Med., v.4, p.569-574,1998.

ZIMMERMANN, U.; VIENKEN, J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. Membr. Biol., New York, v.67, p.165-182, 1982.

