

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CLONES POR
TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM A UTILIZAÇÃO DE OÓCITOS
VITRIFICADOS E DIFERENTES TIPOS CELULARES COMO DOADORES DE
NÚCLEO

Autor: Fabiana Forell

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Reprodução Animal - Biotécnicas de
Reprodução

Orientador: José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fabiana Forell

OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CLONES POR
TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM A UTILIZAÇÃO DE OÓCITOS
VITRIFICADOS E DIFERENTES TIPOS CELULARES COMO DOADORES DE
NÚCLEO

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2008.

APROVADO POR:

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Adriana Bos Mikich
Membro da Comissão - UFRGS

Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Membro da Comissão - FFCMPA

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Comissão – UDESC

Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes
Membro da Comissão - UFRGS

Ao Bira e à Júlia

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pela orientação, amizade, confiança e acima de tudo pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e à Faculdade de Veterinária da UFRGS pela manutenção da infra-estrutura mínima necessária para a realização dos experimentos, ainda que com esforço pessoal de alguns servidores diante das diversas dificuldades.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar as condições necessárias à minha formação profissional desde a graduação, passando pelo mestrado e finalizando com o doutorado, além do apoio enquanto servidora desta casa.

Ao Frigorífico Zimmer, em especial ao Méd. Vet. Fábio Scherer e ao Sr. Curtis, pela extrema boa vontade ao fornecer os ovários, indispensáveis à realização deste trabalho.

À BIO-Biotecnologia Animal pelo fornecimento das células-tronco de tecido adiposo e pelos recursos disponibilizados para o nascimento de um clone produzido durante esta tese. Ao Prof. Dr. Eduardo Birgel Jr. (FMZV/USP) pela assistência e cuidados neonatais intensivos prestados ao clone nascido.

Ao Prof. Dr. Alceu Mezzalira, que colocou à disposição o Laboratório de Reprodução do CAV – UDESC para que fossem realizados alguns experimentos com vitrificação de oócitos, e aos acadêmicos deste laboratório, que auxiliaram de alguma maneira, em especial à Joana Mezzalira.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento/USP que disponibilizou recursos para a realização das análises de DNA mitocondrial. E à Dra. Giovana Krempel Merighe que processou as amostras para análise de DNA mitocondrial dos clones gêmeos.

Ao amigo Michael Höelker, que não poupou esforços para colocar a clonagem em funcionamento no nosso laboratório, trabalhando incansavelmente, e em um período de apenas um mês, conseguiu proporcionar condições para que esta tese pudesse ser desenvolvida, tanto na otimização de diversos procedimentos, como no meu

treinamento em algumas etapas da clonagem e, além disto, proporcionar um convívio extremamente agradável que foi capaz de gerar uma grande amizade.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução que de alguma maneira auxiliaram na execução deste trabalho, em especial ao Felipe com as idas ao frigorífico para a interminável busca aos ovários. Ao Luis Felipe Steigleder pelo apoio nos momentos difíceis. Ao João Roberto, que sempre tinha o mate bem forte para nos revigorar nos intervalos das rotinas. À Leda Gomes Mendes, que apesar de todas as dificuldades sempre esteve pronta para ajudar de todas as maneiras. À Lucila Carboneiro dos Santos pelas horas de convívio dentro do laboratório e fora dele, compartilhando as alegrias e as dificuldades. Ao Arnaldo Diniz Vieira pelas idéias brilhantes na solução de problemas do dia-a-dia do laboratório, além da amizade cultivada com sua família.

Ao super bolsista Cristiano Feltrin, a quem prometi diversas páginas de agradecimentos, que além de auxiliar nas tarefas mais complicadas da rotina de clonagem, sempre teve uma medicação potente para dores musculares.

Aos queridos amigos Alexandre Oliveira e Eliana Lopes pela amizade incondicional, em absolutamente todos os momentos. Aos amigos Luciana e Marcelo Bertolini pelo apoio em todos os momentos, especialmente no auxílio com a revisão na língua inglesa dos artigos. Aos amigos Roberto Furtado, Juliana Schwalm, Clovis Schwalm e Rui Lopes pelo apoio em diversos momentos.

Ao Sérgio Pereira da Silva, cujo trabalho foi de vital importância na fase mais difícil da execução desta tese. Aos amigos Osmar Santos Junior, Vander Gonsales e Marcel Maltez, que me fizeram entender que a cabeça precisa de um corpo para executar as idéias e acabaram me transformando em uma atleta.

Aos meus pais Marli e Alfredo, meu irmão Leandro, sua esposa Fabiana.

E, especialmente, ao Bira e à Júlia pela paciência que tiveram durante a fase mais complicada desta tese, pela alegria que proporcionam na minha vida em todos os momentos.

O que mais me surpreende na humanidade são os homens. Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente e acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer e morrem como se nunca tivessem vivido.

Dalai Lama

RESUMO

A técnica de transferência nuclear é uma ferramenta que possibilita a produção de embriões clones que podem ser utilizados tanto na clonagem reprodutiva, proporcionando o nascimento de produtos, como modelo para o estudo de diversos mecanismos fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário. Este trabalho teve como objetivos a otimização da técnica de clonagem no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução (FAVET, UFRGS), avaliar a taxa de sucesso da clonagem interespecie, e testar a eficiência da utilização de oócitos vitrificados como citoplasmas receptores para a reconstrução dos embriões clones, sendo realizado em três etapas. A primeira teve por objetivo o estabelecimento da técnica de clonagem, bem como sua otimização nas nossas condições, dando condições para que os experimentos subsequentes pudessem ser realizados. Para isto foram realizados experimentos *in vitro* comparando diferentes meios de manipulação, sistemas de ativação química, meios de cultivo e fontes protéicas no cultivo dos embriões, e células oriundas de diferentes origens e animais como doadores de núcleo. Os resultados obtidos *in vitro* alcançaram taxas de 64,7% de clivagem e de 19,5% de blastocistos. Um grupo de embriões foi transferido para receptoras (n=24), e foram observadas 54,2% de prenhez aos 35 dias, 8,3% de prenhez aos 260 dias e 4,2% de nascimentos. A segunda parte dos experimentos teve por objetivo a produção de clones interespecie utilizando o citoplasma bovino como receptor para células ovinas, caprinas e suínas. As taxas de clivagem nos grupos NTSCi ovino (60,3%), caprino (68,4%) e suína (57,1%) não diferiram dos grupos controles NTSC bovino. A taxa de blastocisto observada nos embriões NTSCi ovinos (10,3%) foram semelhantes às taxas observadas no grupo NTSC bovino (12,7%). No grupo NTSCi caprino, 5,3% dos embriões chegaram ao estágio de blastocisto, enquanto que no grupo NTSCi suíno não houve desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Na terceira parte do trabalho, experimentos visando a utilização de oócitos vitrificados imaturos com citoplasma receptor foram realizados. Foram submetidos a maturação 764 complexos cumuli-oócitos vitrificados, e 73,0% destes foram recuperados após o desnudamento e 46,8% apresentavam corpúsculo polar, taxas significativamente inferiores às observadas nos oócitos não vitrificados (91,4% e 65,8%, respectivamente). As taxas de sobrevivência após a micromanipulação (77,8%), taxa de fusão (82,1%) e de sobrevivência após a ativação (79,9%) do grupo vitrificado não apresentaram diferença significativa com o grupo controle não vitrificado. As taxas de blastocistos também não apresentaram diferença entre os grupos vitrificado e não vitrificado (16,7% e 23,4%) respectivamente. Em resumo, os resultados deste trabalho demonstraram que oócitos bovinos frescos ou vitrificados, nas nossas condições estabelecidas, foram capazes de suportar o desenvolvimento de embriões clones bovinos até o estágio de blastocisto ou a termo, e proporcionam citoplasmas compatíveis para o desenvolvimento de embriões clones interespecie até o estágio de blastócito.

ABSTRACT

Somatic cell nuclear transfer (NTCS) procedures is a valuable tool for the production of clone embryos for use in reproductive cloning, by providing the birth of live animals, and for use as a research model, allowing the study of physiologic mechanisms during the embryonic development. This work aimed to optimize cloning procedures at the Embryology and Reproductive Technology Laboratory (FAVET, UFRGS), to evaluate the success rate of interspecies cloning, and to test the effectiveness of vitrified oocytes as recipient cytoplasm for embryo reconstruction, being carried out in three stages. The first stage was focused on the establishment of the cloning technique and the optimization of procedures and conditions in the lab so that the subsequent experiments could be accomplished. Thus, *in vitro* experiments were performed to compare different manipulation media, chemical activation systems, manipulating media, source of protein supplementation to the embryo culture media, and distinct cell types and genotypes. The mean cleavage and blastocyst rates obtained after conditions were optimized were 64.7% and 9.5%, respectively. Pregnancy rates on Days 35 and 260 of gestation and calving rate at term following the transfer of a group of embryos to synchronous recipient cows (n=24) were 54.2%, 8.3% and 4.2%, respectively. The second stage of the study evaluated the success rate of the production of interspecies clones (NTSCi) using the bovine oocyte as recipient cytoplasm for transferred nuclei from ovine, caprine or porcine cells. Cleavage rates using ovine (60.3%), caprine (68.4%) and porcine (57.1%) nuclei did not differ from controls (bovine nuclei). Blastocyst rates observed for NTSCi embryos using ovine nuclei (10.3%) were similar to those observed in the bovine NTSC group (12.7%). The NTSCi-caprine group reached a 5.3% blastocyst rate, whereas no development to the blastocyst stage was observed when using porcine cells as nucleus donor. In the third stage of this work, experiments evaluated the efficiency of vitrified bovine oocytes as recipient cytoplasm for cloning by TNCS. Following vitrification and warming, 764 cumulus-oocyte complexes were *in vitro*-matured. A total of 73.0% was recovered after cumulus removal, with 46.8% presenting visible polar bodies, which were significantly lower than rates observed in non-vitrified oocytes (91.4% and 65.8%, respectively). However, survival rates following micromanipulation (77.8%), fusion rates (82.1%) and survival after activation (79.9%) of oocytes were not different from the control group (non-vitrified oocytes). In addition, blastocyst rates did not differ between vitrified and non-vitrified groups (16.7% and 23.4%, respectively). In summary, results from this study demonstrated that fresh or vitrified bovine oocytes, under our optimized conditions, were able to support development of bovine clone embryos to the blastocyst stage or to term, and provided a compatible cytoplasm for the development of interspecies clone embryos to the blastocyst stage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do ciclo celular. Adaptado de www.cellsalive.com	24
Figura 2. Fases da mitose.	25
Figura 3. Atividade MPF e CSF durante a maturação e fecundação. Adaptado de Madgwick e Jones (2007).	30
Figura 4. Padrão de metilação do DNA no desenvolvimento embrionário de embriões bovinos. Adaptado de Yang <i>et al.</i> (2007b).....	41
Figura 5. Representação esquemática da inativação do cromossomo X em embriões clones comparado aos normais. Adaptado de Yang <i>et al.</i> (2007b).	42
Figura 6. Sistema de vitrificação em gota na extremidade da palheta cortada em bisel.	56
Figura 7. Visualização da placa metafásica e do corpúsculo polar.	59
Figura 8. Corpúsculo polar e placa metafásica dentro da pipeta de micromanipulação após serem removidos do oócito.	59
Figura 9. Célula doadora de núcleo na pipeta de micromanipulação.....	60
Figura 10. Célula doadora de núcleo introduzida no espaço perivitelino.	60
Figura 11. Sistema para a manipulação dos eletrodos de eletrofusão	61
Figura 12. Oócito enucleado com a célula doadora no espaço perivitelino, alinhados ao eletrodo de eletrofusão.	61
Figura 13. Blastocisto em eclosão, submetido à vitrificação e transferência direta para receptora.	72
Figura 14. Fetos abortados encontrados no campo do dia 260 de gestação.....	72
Figura 15. Vaca doadora das células doadoras de núcleo.	73
Figura 16. Neonato clone de animal Nelore com 15 h de vida.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas de desenvolvimento <i>in vitro</i> de oócitos ativados partenogeneticamente após manutenção em meio TCM-HEPES ou HSOF.	67
Tabela 2. Taxa de desenvolvimento de embriões NTSC bovinos ativados quimicamente com ionomicina e subseqüentemente com CHX+CD ou 6DMAP.	67
Tabela 3. Taxas de desenvolvimento de embriões clones interespécie, de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula ovina utilizando diferentes protocolos de ativação.	68
Tabela 4. Taxas de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões partenogênicos cultivados em meio SOF ou NCSU.	68
Tabela 5. Taxas de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões partenogênicos cultivados em meio SOF ou KSOM.	68
Tabela 6. Taxa de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões NTSC cultivados em meio SOF suplementado com SVE ou BSA.	69
Tabela 7. Taxas de desenvolvimento de embriões clones interespécie, de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula ovina utilizando diferentes fontes protéicas no meio de cultivo.	69
Tabela 8. Taxa de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões clones obtidos a partir de animais diferentes.	69
Tabela 9. Taxa de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões clones obtidos a partir de dois tipos celulares de um animal.	70
Tabela 10. Taxa de desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões clones obtidos a partir de três tipos celulares e animais diferentes.	70
Tabela 11. Taxa de desenvolvimento <i>in vivo</i> de embriões clones obtidos a partir de três tipos celulares e animais diferentes.	70
Tabela 12. Taxa de desenvolvimento <i>in vivo</i> de embriões clones submetidos ou não à vitrificação.	71
Tabela 13. Taxas de fusão de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora ovina ou bovina.	74

Tabela 14. Taxas de desenvolvimento de embriões clones interespecie (ovino-bovino) e homoespecíficos (bovino-bovino), cultivados em meio SOF suplementado com SVE.....	74
Tabela 15. Taxas de fusão de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora caprina ou bovina.....	75
Tabela 16. Taxas de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora caprina ou bovina.....	75
Tabela 17. Taxas de fusão de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora suína ou bovina.....	76
Tabela 18. Taxas de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora suína ou bovina.....	76
Tabela 19. Taxa de recuperação após o desnudamento e de maturação, avaliada pela presença de PB, dos CCOs vitrificados e controle (frescos).....	76
Tabela 20 Eficiência e eficiência cumulativa durante as etapas da clonagem utilizando oócitos vitrificados e não vitrificados como citoplasma receptor.....	77
Tabela 21. Taxas de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de embriões produzidos por transferência nuclear utilizando como citoplasma receptor oócitos vitrificados ou não vitrificados.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrometro(s)
µM	micromolar(s)
µs	microsegundo(s)
°	grau(s)
°C	grau(s) Célsius
6DMAP	dimetilaminopurina
APV/C	complexo promotor de anáfase/ciclosomo
BSA	albumina sérica bovina
Ca ⁺²	íon cálcio
CCO	complexo <i>cumulus oophorus</i>
CCOs	complexos <i>cumuli oophorus</i>
CD	citocalasina D
CDK	quinase dependente de ciclina
CHX	ciclohexamida
Cl ⁻	íon cloro
CO ₂	dióxido de carbono
CpG	dinucleotídeo citosina-guanina
CSF	fator citostático
DAG	diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucléico
Dnmt	DNA metiltransferase
EG	etilenoglicol
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
FDP	pipetas flexíveis de desnudamento
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama(s)
G0	<i>Gap 0</i> ou quiescência

G1	<i>Gap 1</i> ou intervalo 1
G2	<i>Gap 2</i> ou intervalo 2
GMP	<i>open-pulled glass micropipettes</i>
GV	vesícula germinal
GVBD	ruptura da vesícula germinal
h	hora
H2A	histona 2A
H2B	histona 2B
H3	histona 3
H4	histona 4
HAT	histona acetiltransferase
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HDAC	histona deacetilase
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HMC	<i>handmade cloning</i>
HMT	histona metiltransferase
HSOF	<i>HEPES-buffered synthetic oviduct fluid</i>
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IgG	imunoglobulina G
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	receptor do IP ₃
K ⁺	íon potássio
kg	quilograma(s)
KSOM	<i>higher K⁺ simplex optimization medium</i>
LH	hormônio luteinizante
LOS	<i>large offspring syndrome</i>
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein</i> quinase
MEK	MAPK quinase
MEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
mg	miligrama(s)
Mg ⁺²	íon magnésio
MI	metáfase I
MII	metáfase II
min	minuto(s)

mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar(s)
MPF	fator promotor da maturação, <i>maturation promoting factor</i> ou <i>M-phase promoting factor</i>
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
mV	milivolt(s)
MVC	<i>minimum volume cooling</i>
N ₂ L	nitrogênio líquido
Na ⁺	íon sódio
NCSU23	meio de cultivo <i>North Carolina State University 23</i>
NPCs	complexos de poros nucleares
NT	transferência nuclear
NTEC	transferência nuclear de células embrionárias
NTSC	transferência nuclear de células somáticas
NTSCi	transferência nuclear de célula somática interespecie
O ₂	oxigênio
OPG	<i>open-pulled glass capillaries</i>
OPS	<i>open-pulled straw</i>
PB	corpúsculo polar
PCC	prematura condensação dos cromossomos
PcG	proteínas do grupo <i>Polycomb</i>
pCO ₂	pressão de dióxido de carbono
pH	potencial hidrogeniônico
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	proteína-quinase C
PLC	fosfolipase C
pm	peso molecular
pO ₂	pressão de oxigênio
PRC	complexo repressor <i>Polycomb</i>
rDNA	DNA ribossomal
REL	retículo endoplasmático liso
RNA	ácido ribonucléico
S	fase de síntese do ciclo celular

s	segundo(s)
SAC	sacarose
SFB	soro fetal bovino
SOF	<i>synthetic oviduct fluid</i>
SSV	<i>solid-surface vitrification</i>
SV	solução de vitrificação
SVE	soro de vaca em estro
TCM	<i>tissue culture medium</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Histórico da Clonagem.....	22
2.2 Ciclo Celular e sua Regulação.....	24
2.2.1 Ciclo Mitótico	24
2.2.2 Ciclo Meiótico.....	26
2.2.2.1 O MPF e sua Regulação	26
2.2.2.2 Cascata MAPK	27
2.3 Citoplasma Receptor	28
2.4 Célula Doadora	30
2.4.1 Células Somáticas Adultas e Fetais	30
2.4.2 Tecido de Origem da Célula Doadora.....	31
2.4.3 Linhagens Celulares	31
2.4.4 Tempo de Cultivo da Célula Doadora.....	32
2.4.5 Sistema de Cultivo da Célula Doadora	32
2.4.6 Fase do Ciclo Celular para Clonagem.....	33
2.5 Fusão e Heteroplasmia	33
2.6 Ativação	35
2.6.1 Ativação pela Fecundação	35
2.6.2 Ativação Artificial na Transferência Nuclear	36
2.6.2.1 Ativação Partenogenética	36
2.6.2.2 Ativação de Oócitos Reconstruídos.....	36
2.7 Reprogramação e Desenvolvimento Embrionário	38
2.7.1 Desenvolvimento Embrionário Inicial após a Fecundação	38
2.7.2 Memória Celular e Reprogramação das Células Transferidas para Oócitos Enucleados em MII	39
2.8 Criopreservação de Embriões Clones.....	43
2.9 Desenvolvimento <i>in vivo</i>	44
2.10 Transferência Nuclear de Célula Somática Interespécie	46
2.11 Criopreservação de Oócitos.....	48
2.11.1 Injúrias Durante a Criopreservação.....	50

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1 Água e Reagentes.....	52
3.2 Obtenção e Seleção dos Oócitos	52
3.3 Obtenção e Cultivo das Células Doadoras de Núcleo	53
3.3.1 Cultivo Primário.....	53
3.3.2 Cultivo Secundário.....	54
3.3.3 Congelamento das Células	54
3.3.4 Descongelamento e Utilização das Células	55
3.3.5 Células-Tronco Obtidas de Tecido Adiposo	55
3.4 Vitrificação dos CCOs Imaturos e Reaquecimento.....	56
3.5 Maturação dos Oócitos Frescos e Vitricados.....	57
3.6 Manipulação e Manutenção das Estruturas	57
3.7 Enucleação	57
3.8 Reconstrução.....	58
3.9 Ativação	62
3.10 Ativação Partenogenética e Cultivo <i>in vitro</i>	62
3.11 Cultivo <i>in vitro</i>	62
3.12 Avaliação do Desenvolvimento <i>in vitro</i>	63
3.13 Vitricificação dos Embriões.....	63
3.14 Análise Estatística.....	63
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	64
4.1 Otimização da Técnica de Transferência Nuclear	64
4.1.1 Efeito do meio de manutenção em atmosfera ambiente	64
4.1.2 Otimização do sistema de ativação química	64
4.1.3 Efeito do meio de cultivo sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i>	64
4.1.4 Efeito da fonte protéica no meio de cultivo embrionário.....	65
4.1.5 Efeito do genótipo da célula doadora de núcleo para embriões NT	65
4.1.6 Efeito do tipo celular da célula doadora de núcleo para embriões NTSC	65
4.1.7 Vitricificação dos embriões clones e avaliação <i>in vivo</i>	65
4.2 Produção de Embriões Interspécie (NTSCi)	65
4.2.1 Produção de embriões clones NTSCi ovino-bovino	66
4.2.2 Produção de embriões clones NTSCi caprino-bovino	66
4.2.3 Produção de embriões clones NTSCi suíno-bovino	66
4.3 Utilização de Oócitos Vitricificados como Citoplasma Receptor.....	66

5 RESULTADOS	67
5.1 Otimização da Técnica de Transferência Nuclear	67
5.1.1 Efeito do meio de manutenção em atmosfera ambiente	67
5.1.2 Otimização do sistema de ativação química	67
5.1.3 Efeito do meio de cultivo sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i>	68
5.1.4 Efeito da fonte protéica no meio de cultivo SOF.....	68
5.1.5 Efeito do genótipo da célula doadora de núcleo para embriões NT	69
5.1.6 Efeito do tipo celular da célula doadora de núcleo na NTSC	69
5.1.7 Efeito do genótipo e da origem da célula doadora de núcleo sobre o desenvolvimento <i>in vitro e in vivo</i>	70
5.1.8 Efeito da vitrificação dos embriões NTSC sobre o desenvolvimento <i>in vivo</i>	71
5.1.9 Avaliação do desenvolvimento perinatal	71
5.2 Produção de Clones Interespécie (NTSCi)	74
5.2.1 Produção de embriões NTSCi ovino-bovino	74
5.2.2 Produção de embriões NTSCi caprino-bovino	74
5.2.3 Produção de embriões NTSCi suíno-bovino.....	75
5.3 Produção de Clones Bovinos Utilizando como Citoplasma Receptor Oócitos Vitrificados	76
6 DISCUSSÃO	78
6.1 Otimização da Técnica de Transferência Nuclear	78
6.1.1 Prenhez gemelar	80
6.2 Oócitos Bovinos como Citoplasma Receptor na NTSCi	81
6.3 Oócitos vitrificados como citoplasma receptor	83
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE A – Meio para transporte de ovários (Solução Fisiológica).....	105
APÊNDICE B – Meio para manipulação dos ovários (PBS)	106
APÊNDICE C – Meio TCM-HEPES.....	107
APÊNDICE D – Meio para cultivo celular (DMEM).....	108
APÊNDICE E – Meio para tripsinização das células (Trypsina Versene – VT).....	109
APÊNDICE F – Meio SOF-HEPES (HSOF)	110
APÊNDICE G – Meio de maturação <i>in vitro</i> - TCM199	111
APÊNDICE H – Meio de fusão	112
APÊNDICE I – Meio de cultivo embrionário NCSU23	113

APÊNDICE J – Meio de cultivo embrionário SOF	114
APÊNDICE K – Meio de cultivo embrionário KSOM.....	115
APÊNDICE L – Evolução clínica do clone	116
APÊNDICE M – Achados macroscópicos na necropsia do clone.....	120
ANEXO A – Laudo da análise de DNA microssatélite	123
ANEXO B – Análise de DNA microssatélite do feto 1	124
ANEXO C – Análise de DNA microssatélite do feto 2.....	125
ANEXO D – Análise de DNA microssatélite da doadora	126
ANEXO E – Análise de DNA microssatélite da receptora.....	127
ANEXO F – Laudo de necropsia do feto 1	128
ANEXO G – Laudo de necropsia do feto 2	129
ANEXO H – Análise do DNA mitocondrial dos fetos abortados.....	130
ANEXO I – Laudo histopatológico do clone nascido.....	134
ANEXO J – Fotos da histopatologia do clone nascido.....	135

1 INTRODUÇÃO

A técnica de transferência nuclear com célula somática desperta grande interesse na comunidade científica há muitos anos, entretanto, com o nascimento da Dolly o interesse por esta metodologia ultrapassou as fronteiras da ciência e alcançou o público em geral.

A clonagem reprodutiva é uma ferramenta que possibilita a produção de indivíduos idênticos, e hoje em dia vem sendo empregada como ferramenta para a multiplicação de indivíduos de alto valor zootécnico. Além disto, alguns grupos de pesquisa vêm utilizando a clonagem reprodutiva como alternativa para a reprodução de animais selvagens. Outra aplicação da técnica de transferência nuclear é a sua utilização como modelo para o estudo de diversos mecanismos fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário, fetal e neonatal. O grande obstáculo da clonagem reprodutiva para sua aplicação em grande escala é a sua eficiência que ainda é muito baixa, especialmente, quando analisamos a eficiência *in vivo*. Apesar de embriões clones proporcionarem taxas de prenhez iniciais relativamente satisfatórias, as perdas ao longo da gestação e mortalidade neonatal são muito altas. Esta alta mortalidade pode ser vista como um aspecto negativo do ponto de vista econômico e comercial. Entretanto, também pode ser vista como um aspecto positivo do ponto de vista científico, uma vez que inúmeros conhecimentos foram gerados na tentativa de solucionar tais problemas e diversos campos da ciência vêm surgindo e se consolidando em função disto, especialmente as áreas que tentam entender aspectos específicos da fisiologia da gestação e da neonatologia bovina. Muitos aspectos *in vitro* também estão sendo estudados utilizando-se o modelo da transferência nuclear, tais como a heteroplasmia e os mecanismos epigenéticos envolvidos na reprogramação celular.

Apesar dos resultados *in vitro* ainda serem muito baixos e inconstantes, os resultados *in vitro* tendem a ser mais homogêneos. Entretanto, fases com baixa eficiência ou com a completa ausência de resultados são relatadas por inúmeros grupos de pesquisa. Isto mostra que muitos fatores que interferem diretamente sobre os resultados estão fora do controle dos pesquisadores, tendo em vista que para o sucesso desta técnica, muitas variáveis de difícil controle podem interferir. Desta maneira, a implementação desta técnica em um determinado laboratório não requer apenas a simples execução de um protocolo, mas sim a otimização das técnicas empregadas e a

adequação às diferentes condições. Além disto, os problemas observados *in vivo* tendem a ser diferentes em cada grupo de pesquisa e ainda diferentes em cada indivíduo nascido, sem aparente correlação com o protocolo utilizado. Desta maneira, o estabelecimento de um protocolo que seja prático e eficiente é a primeira etapa que deve ser executada pelo laboratório que deseja utilizar esta tecnologia. O objetivo primário deste trabalho foi atender esta exigência, estabelecendo um protocolo adequado para a rotina de clonagem que permita a produção *in vitro* de embriões transferíveis para receptoras.

A segunda etapa do trabalho teve por objetivo a produção de embriões clones interespecie, uma vez que o interesse por esta tecnologia vem crescendo em nível mundial, tendo por objetivo final a utilização desta estratégia para a possível preservação de espécies ameaçadas. Além disto, a utilização de oócitos bovinos como citoplasma receptor para espécies domésticas pode servir para a clonagem de espécies cuja obtenção de oócitos ou a maturação *in vitro* representem uma dificuldade. A clonagem interespecie com espécies domésticas também pode servir de modelo, tanto para o uso com espécies selvagens como para o estudo do comportamento mitocondrial nos embriões clones.

A terceira parte desta tese foi a utilização de oócitos vitrificados antes da maturação como fonte de citoplasma receptor para a clonagem. Variações sazonais e a grande distância entre abatedouros e os laboratórios que realizam clonagem podem representar uma dificuldade prática na execução da técnica. A possibilidade de armazenamento de oócitos nos períodos mais favoráveis e sua posterior utilização nos períodos mais críticos representa um grande avanço na execução desta tecnologia. Apesar de não haver relato na literatura internacional referindo a utilização de oócitos imaturos na clonagem, optamos por este tipo de oócito justamente por dispensar uma estrutura laboratorial complexa para sua criopreservação, podendo ser transportado após a criopreservação com tranquilidade até o laboratório.

Os dados aqui apresentados representam o primeiro trabalho com esta técnica no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da FAVET/UFRGS, abrindo espaço para futuros experimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Clonagem

A reprodução assexuada é utilizada por plantas, bactérias, fungos e protozoários e garante a manutenção de indivíduos evolutivamente adaptados ao meio. A reprodução sexuada proporciona um aumento na diversidade genética, favorecendo os processos evolutivos.

A palavra clone deriva do termo grego *klon* que significa broto. Como definição, a clonagem é uma maneira de reprodução assexuada, ou seja, sem o envolvimento de gametas, onde os indivíduos gerados são geneticamente idênticos.

Desta maneira, quando temos indivíduos com a mesma carga genética podemos chamá-los de clones, como é o caso de gêmeos idênticos. Este processo pode ser ao acaso, como ocorre na maioria dos mamíferos, incluindo os humanos e bovinos, ou controlado, como ocorre em espécies de tatu, onde todos os filhotes de uma ninhada são gêmeos idênticos (Foote, 2002).

Várias metodologias foram descritas para a produção de clones. Dentre elas podemos citar, a bipartição de embriões, utilizada atualmente de maneira comercial em programas de transferência de embriões. Esta metodologia foi inicialmente utilizada por Moustafa e Hahn em 1978 para divisão de mórulas murinas e resultou no nascimento de gêmeos idênticos (Foote, 2002). A desagregação de blastômeros também foi utilizada, experimentalmente, na produção de clones de ovelhas no final da década de 70 e início da década de 80. Steen Willadsen desagregou 5 embriões de ovelhas no estágio de 2-células e obteve o nascimento de 10 cordeiros (Willadsen, 1979). Posteriormente, em outro experimento, desagregou um embrião de 8-células e obteve o nascimento de 5 cordeiros (Willadsen, 1981).

Atualmente, o termo clonagem é associado à técnica de transferência nuclear (NT). Por esta metodologia, o núcleo de uma célula doadora é transferido para um citoplasma enucleado, ou seja, uma célula sem DNA genômico, onde ocorre o desenvolvimento embrionário. Inicialmente, esta técnica foi utilizada em anfíbios e resultou no desenvolvimento de embriões de rã (*Rana pipiens*) (Briggs e King, 1952). Dez anos mais tarde, em 1962, John Gurdon produziu rãs adultas férteis (*Xenopus laevis*) utilizando a transferência nuclear (Gurdon e Byrne, 2004).

Apesar do sucesso na utilização da transferência nuclear em anfíbios, o início da aplicação desta técnica em mamíferos surgiu com muitas controvérsias. Em 1981, Illmensee e Hoppe obtiveram nascimentos de camundongos produzidos por NT utilizando, como células doadoras, células do botão embrionário (Illmensee e Hoppe, 1981). Entretanto, outros pesquisadores não conseguiram repetir estes resultados e durante alguns anos este trabalho foi alvo de questionamento científico, suspeito de fraude (Marx, 1983b; Marx, 1983a; Newmark, 1983).

Em 1986, Willadsen utilizou blastômeros desagregados de embriões ovinos no estágio de 8-células como células doadora de núcleo na transferência nuclear (Willadsen, 1986). Como os relatos de Illmensee sobre camundongos não puderam ser repetidos, muitos autores consideram as ovelhas de Willadsen como os primeiros mamíferos clonados por transferência nuclear (Wilmot *et al.*, 2000). O relato de Willadsen mostrou que a técnica de transferência nuclear utilizando células embrionárias possibilita o nascimento de produtos viáveis em mamíferos. Entretanto, apenas células totipotentes haviam sido utilizadas na clonagem, e o dogma do uso de células diferenciadas foi quebrado apenas em 1995, quando Campbell e colaboradores obtiveram o nascimento de dois cordeiros, Megan e Morag, nascidos a partir de células embrionárias cultivadas e diferenciadas *in vitro*. Portanto, células diferenciada, foram reprogramadas e deram origem a um indivíduo (Campbell *et al.*, 1996; Campbell, 2007).

Em 1996, com o nascimento da ovelha Dolly, outro dogma foi quebrado pelo mesmo grupo de pesquisadores, comprovando a viabilidade de produzir clones a partir de células diferenciadas de animais adultos (Wilmot *et al.*, 1997). Um ano mais tarde, em 1997, no mesmo instituto, nasceu Polly, o primeiro mamífero transgênico produzido por transferência nuclear. A ovelha Polly foi produzida a partir de fibroblastos fetais cultivados *in vitro* e transfectados com o gene do fator IX de coagulação humano (Schnieke *et al.*, 1997). Até este momento animais transgênicos tinham sido obtidos apenas pela técnica de microinjeção de DNA. Com este avanço, a clonagem por transferência nuclear pode ser considerada como uma ferramenta para a produção de animais transgênicos (Campbell, 2007).

A partir destes trabalhos bem sucedidos, foi possível o nascimento de clones em muitas espécies domésticas e algumas selvagens, tais como bovinos (Kato *et al.*, 1998), camundongos (Wakayama *et al.*, 1998), caprinos (Baguisi *et al.*, 1999), suínos

(Polejaeva *et al.*, 2000), carneiro montês da Europa (Loi *et al.*, 2001), bisão indiano (Vogel, 2001), gato doméstico (Shin *et al.*, 2002), coelho (Chesne *et al.*, 2002), cavalo (Galli *et al.*, 2003), rato (Zhou *et al.*, 2003), mula (Woods *et al.*, 2003), gato selvagem (Gómez *et al.*, 2004), boi de Java (Janssen *et al.*, 2004), cão (Lee *et al.*, 2005), furão (Li *et al.*, 2006b) e lobo cinzento (Kim *et al.*, 2007).

2.2 Ciclo Celular e sua Regulação

O maior conhecimento dos eventos do ciclo celular permitiu que animais clones fossem produzidos a partir de células diferenciadas e cultivadas *in vitro* (Campbell *et al.*, 1996; Wilmut *et al.*, 1997).

2.2.1 Ciclo Mitótico

Os dois maiores processos, comuns a todos os ciclos celulares, são as fases “S” (síntese) quando os cromossomos são replicados e a fase “M” (mitose e citocinese) quando os cromossomos replicados são divididos em duas células filhas. O intervalo entre as fases “S” e “M” é chamado de “G2” (*Gap 2* ou intervalo 2). Em muitos casos, existe um intervalo de tempo entre a fase “M” e a próxima fase “S”, denominado “G1” (*Gap 1* ou intervalo 1) e algumas células podem parar o processo de divisão e entrar em uma fase chamada G0, conforme figura abaixo (Doree e Hunt, 2002).

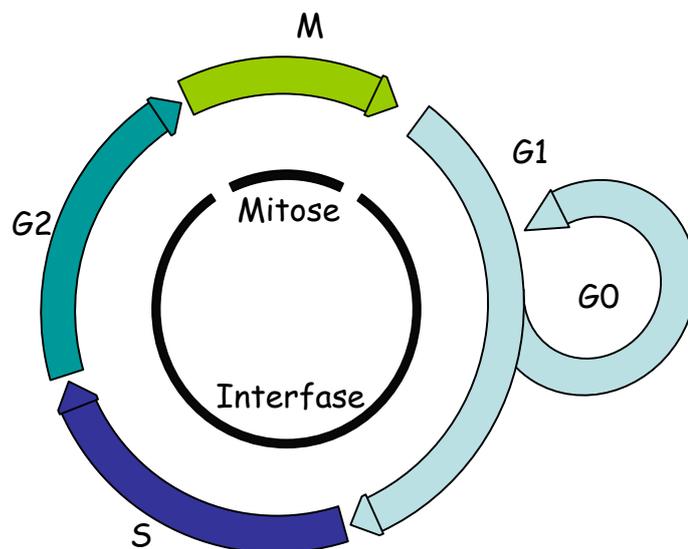


Figura 1. Fases do ciclo celular. Adaptado de www.cellsalive.com.

As fases G1, S e G2 são consideradas como interfase, onde o envelope nuclear está presente e os cromossomos aparecem descondensados. É na interfase que ocorre a síntese de RNAs mensageiros (mRNA), síntese protéica e o aumento do tamanho da

célula. Desta maneira, a célula com seu DNA duplicado entra na fase M que pode ser dividida em mitose e citocinese. As fases da mitose estão ilustradas na Figura 2.

Após a citocinese, a célula pode continuar o processo de divisão ou parar sua proliferação. Os parâmetros bioquímicos das células que entram em “quiescência” ou G0 permanecem pobremente entendidos. Entretanto, aquelas que continuam a se proliferar avançam na fase G1 (Malumbres e Barbacid, 2005). O ciclo celular apresenta vários pontos de checagem e o progresso entre as fases do ciclo celular é controlado por quinases dependentes de ciclinas (CDKs). A atividade destas quinases varia de acordo com o progresso do ciclo celular, levando diretamente à mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular – replicação do DNA, mitose e citocinese (Alberts *et al.*, 2004). As CDKs são reguladas por ciclinas específicas de acordo com a fase do ciclo celular (Malumbres e Barbacid, 2005).

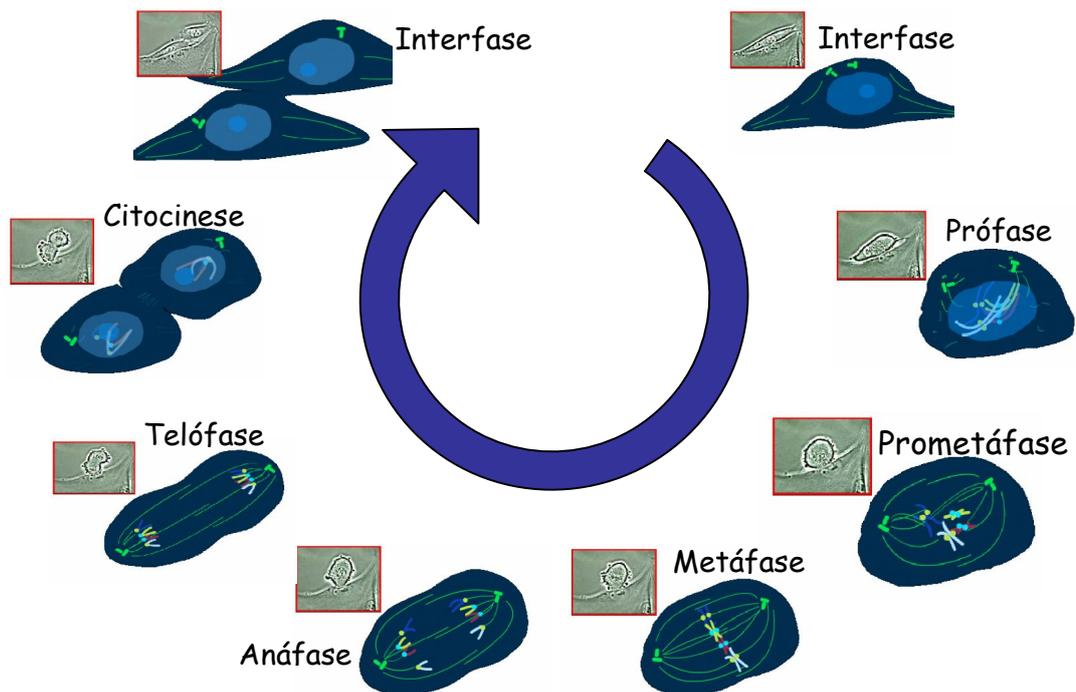


Figura 2. Fases da mitose. A mitose pode ser dividida em: prófase, onde os cromossomos replicados (cromátides-irmã) se condensam, o fuso mitótico se forma e o envelope nuclear permanece intacto; prometáfase, onde ocorre a quebra do envelope nuclear e os cromossomos ligam-se aos microtúbulos do fuso; metáfase, em que os cromossomos ficam alinhados na região equatorial do fuso mitótico; anáfase, onde as cromátides-irmã se separam sincronizadamente para formar dois cromossomos filhos; e telófase, em que os dois conjuntos de cromátides-irmã chegam aos pólos e se descondensam, ocorre a síntese do novo envelope nuclear e a divisão do citoplasma se inicia. Na citocinese, o citoplasma é dividido e duas células filhas idênticas se formam. Adaptado de www.cellsalive.com.

2.2.2 Ciclo Meiótico

A meiose é um tipo especial de divisão celular que reduz pela o número de cromossomos e ocorre com as células germinativas durante a formação de gametas. O processo é semelhante à mitose, porém, envolve duas divisões celulares consecutivas (meiose I e meiose II), com apenas uma etapa de replicação. Desta maneira, a partir de uma célula diplóide são formadas quatro células haplóides diferentes uma da outra. Na prófase da meiose I, ocorre a recombinação cromossômica ou *crossing over*, que garante a diversidade entre as células produzidas. A segunda etapa (meiose II) é equacional, ou seja, ocorre sem que haja a fase S, ocorrendo assim a diminuição do número de cromossomos (Alberts *et al.*, 2004). A regulação da meiose é realizada por uma série de proteíno-quinases.

2.2.2.1 O MPF e sua Regulação

O Fator Promotor da Maturação (MPF - *Maturation Promoting Factor* ou *M-Phase Promoting Factor*) atua em células somáticas durante a mitose e nos oócitos durante a meiose promovendo a quebra do envelope nuclear, induzindo a condensação da cromatina e participando da formação do fuso meiótico (Madgwick e Jones, 2007). O MPF é uma serino/treonino-quinase da classe das quinases dependentes de ciclina (Cdks), também chamado de complexo Cdk1/Ciclina B. A forma ativa do MPF é composta por uma subunidade catalítica e outra regulatória. A subunidade catalítica é formada pela Cdk1 ou p34^{cdc2}kinase, é estável e tem sua concentração constante. A subunidade regulatória é a Ciclina B1 que é instável, sendo constantemente degradada e sintetizada sendo a responsável pelo controle fino da atividade do MPF (Williams, 2002).

O Cdk1, componente catalítico do MPF, regula o ciclo celular através da fosforilação de componentes celulares. A fosforilação da histona H1 (Choi *et al.*, 1991) induz a condensação da cromatina (Meinecke e Kirschke, 2003). No citoesqueleto, o MPF atua fosforilando os filamentos intermediários, desestabilizando a lâmina nuclear induzindo o rompimento do envelope nuclear (Dessev *et al.*, 1991).

O controle da atividade do MPF é realizado pela concentração da unidade regulatória Ciclina B1. A Ciclina B1 está sendo constantemente sintetizada, entretanto, sua degradação é desencadeada pela atividade ubiquitina-ligase do “complexo promotor de anáfase/ciclosomo” (APC/C). E o equilíbrio entre a sua síntese e sua degradação é

que determina a sua concentração e a conseqüente atividade do MPF (Madgwick e Jones, 2007). A ubiquitinização e conseqüente degradação da Ciclina B é inibida pelo CSF ou fator citostático (Hansen *et al.*, 2007). O CSF é formado por uma série de componentes tais como *c-mos*, MEK, MAPK e Emi2, entretanto, a sua exata composição ainda é desconhecida (Madgwick e Jones, 2007).

Sabe-se também que os componentes do CSF são desestabilizados na presença de alta concentração de Ca^{+2} . Além disto, a atividade do APC/C é aumentada até 6 vezes na presença de Ca^{+2} (Madgwick e Jones, 2007). Em última análise, o Ca^{+2} desempenha um papel fundamental no controle destes eventos do ciclo celular, de maneira que a elevação da concentração do Ca^{+2} citoplasmático induz a diminuição drástica da atividade do MPF.

2.2.2.2 Cascata MAPK

Outra proteíno-quinase importante na regulação da meiose é a *mitogen-activated protein* quinase (MAPK), também denominada de *extracellular regulated kinase* (ERK). Apesar de sua atividade não ser suficiente para manter a progressão da meiose sozinha (Fan e Sun, 2004), juntamente com o MPF, a MAPK desempenha um papel importante na transição da meiose I para a meiose II e durante a manutenção da metáfase II (MII) até a fecundação (Motlik *et al.*, 1998). Ela é ativada, por fosforilação durante a maturação do oócito e está envolvida na regulação dos microtúbulos (Motlik *et al.*, 1998).

A MAPK é uma serino/treonino quinase que requer a fosforilação em seus resíduos de treonina-183 e tirosina-185 para estar ativa (Fan e Sun, 2004). Ela é ativada por sinais extracelulares específicos (como fatores de crescimento) que pertencem a diferentes vias de sinalização. Por esta razão, MAPK é também chamada de ERK (Meinecke e Krschek, 2003). O sinal intracelular consiste de uma cascata de enzimas específicas. A fosforilação dos resíduos treonina-183 e tirosina-185 é realizada pela MEK (também chamada de MAPK quinase, MAPK-ERK quinase). MEK é ativada por fosforilação promovida pela proteíno-quinase Mos, produto do proto-oncogene *c-mos* (Fan e Sun, 2004).

A MAPK fosforilada está associada com a formação do fuso, de maneira que a cascata da MAPK não é necessária para a retomada da maturação, mas sim para a dinâmica dos microtúbulos no fuso meiótico (Meinecke e Krschek, 2003).

A MAPK desempenha inúmeras funções nucleares, incluindo a atuação sobre ativadores transcricionais e citosólicos e a fosforilação de proteínas do citoesqueleto (Fissore *et al.*, 1996). As funções da cascata da MAPK incluem a regulação da montagem do fuso meiótico, garantem a divisão assimétrica da meiose I, mantém a configuração normal do fuso e a estagnação na MII, é requerida para a extrusão do segundo corpúsculo polar e é incompatível com a formação da membrana pró-nuclear. A MAPK é indispensável componente do CSF (Fan e Sun, 2004).

2.3 Citoplasma Receptor

O citoplasma receptor, usualmente utilizado na NTSC, é obtido pela remoção do material genético nuclear de oócitos maturados *in vitro*. A maturação oocitária é um processo complexo que envolve uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos de maneira sincronizada, que garante ao oócito a habilidade de suportar o desenvolvimento embrionário após a fecundação. Os oócitos adquirem a habilidade de serem fecundados e produzem embriões viáveis em ondas de crescimento e maturação, a partir da puberdade. Dentro dos folículos, os oócitos estagnados na prófase da meiose I, também chamados de vesícula germinal (GV), crescem até o seu tamanho máximo. Depois de terminado o crescimento do oócito, o folículo continua a crescer até chegar ao tamanho ovulatório. Neste momento, surge o pico de hormônio luteinizante (LH) que induz a liberação do oócito em Metáfase II ao oviduto, apto a ser fecundado. Apesar do período de crescimento do oócito e desenvolvimento folicular ocorrer em semanas, a retomada da meiose, ou seja a transição de GV para MII inicia apenas 24 h antes da ovulação (em bovinos) e é referida como “maturação oocitária” (Fissore *et al.*, 2002a).

A maturação citoplasmática é bastante complexa e envolve eventos ainda pouco conhecidos. Sabemos que nesta fase existe uma intensa atividade transcricional, para compor o estoque de mRNA que será utilizado na síntese protéica durante o início do desenvolvimento embrionário até a completa ativação do seu próprio genoma (Hyttel *et al.*, 1997). Outro evento importante nesta etapa, é a reorganização das organelas citoplasmáticas, que incluem o alinhamento periférico dos grânulos corticais para possibilitar o bloqueio à poliespermia, o rearranjo mitocondrial, o armazenamento de lipídeos como estoque energético e a redução do complexo de Golgi (Hyttel *et al.*, 1997).

As células da granulosa estão intimamente ligadas ao processo de maturação e também se transformam neste período. Estas células se multiplicam e produzem os

hormônios necessários para a maturação do oócito. No início do processo de maturação, elas são responsáveis pela produção de estradiol. Por outro lado, no final da maturação, por efeito do LH, estas células iniciam o processo de luteinização passando a sintetizar a progesterona. Além disto, ocorre uma grande expansão das células do *cumulus oophorus*, em função do aumento do seu número e da produção da matriz extracelular, composta, principalmente, por ácido hialurônico, o que lhes confere o aspecto mucificado. Inicialmente, as células do *cumulus* mantêm contato íntimo com a membrana citoplasmática do oócito através de projeções celulares que atravessam a zona pelúcida, fornecendo os substratos necessários para o desenvolvimento do oócito. Entretanto, durante a maturação estas ligações vão ficando menos intensas ao ponto de praticamente desaparecerem ao final do processo (Gordon, 2003).

A maturação nuclear também é chamada de maturação meiótica. A maturação meiótica permite que o oócito estacionado como vesícula germinal chegue até a metáfase da meiose II (Bhojwani *et al.*, 2006). O primeiro evento que ocorre é a quebra de vesícula germinal (GVBD). A GVBD é caracterizada pela gradual condensação da cromatina, pela desintegração da membrana nuclear e pela formação do fuso meiótico. Estes eventos são desencadeados pela presença de MPF que aumenta gradualmente até seu nível máximo em metáfase I (MI). O MPF tem uma diminuição no período entre MI e MII quando volta a estar em sua máxima concentração nesta última fase, momento em que ocorre a extrusão do 1º corpúsculo polar (Figura 3). Os oócitos permanecem em MII, as custas de uma alta concentração de MPF, até que sejam ativados pela fecundação. Esta concentração elevada de MPF é garantida pelos altos níveis de CSF, prevenindo assim, a ativação partenogénica, até que ocorra a fecundação (Madgwick e Jones, 2007).

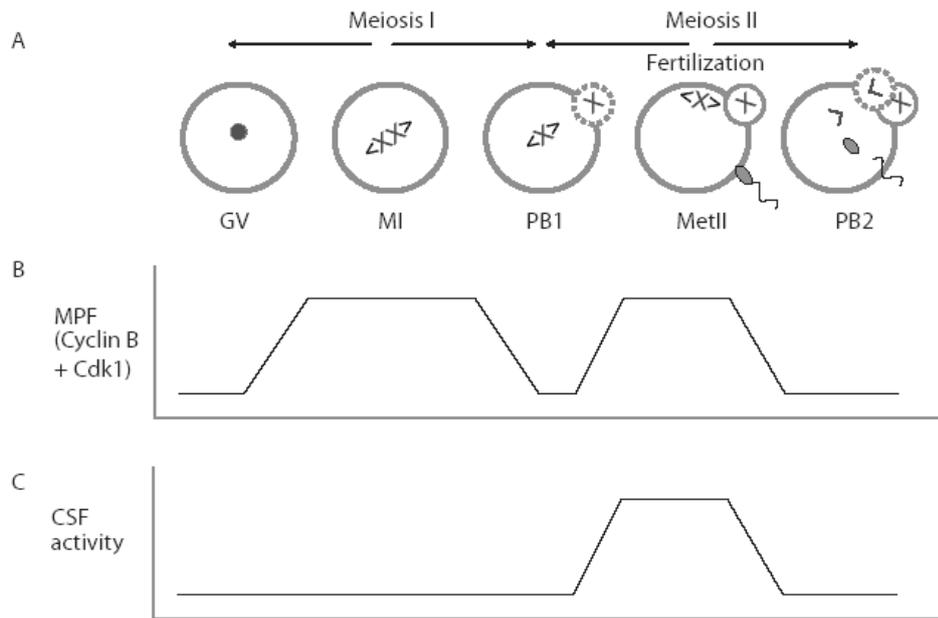


Figura 3. Atividade MPF e CSF durante a maturação e fecundação. Adaptado de Madgwick e Jones (2007).

2.4 Célula Doadora

A célula doadora tem um papel fundamental na clonagem, podendo inclusive determinar o sucesso ou não do procedimento (Powell *et al.*, 2004). Muitos pesquisadores vêm estudando o efeito da célula doadora sobre o desenvolvimento embrionário e fetal, entretanto não existe um consenso sobre as ideais condições de cultivo bem como a sua origem.

2.4.1 Células Somáticas Adultas e Fetais

Células somáticas adultas usualmente são mais difíceis de serem reprogramadas do que células fetais. Isto pode ser observado pelas taxas de desenvolvimento *in vivo* obtidas com células destas duas origens. Heyman *et al.* (2002) avaliaram o desenvolvimento *in vivo* de embriões bovinos produzidos por FIV, por NTEC (células embrionárias), NTSC fetais e NTSC adulta. Observaram que as taxas de não retorno ao estro aos 21 dias não diferiram significativamente em nenhum dos grupos (entre 55 e 62%), entretanto já com 35 dias de gestação as taxas de prenhez dos embriões produzidos por NTSC (células adultas e fetais) foram significativamente menores do que as taxas de prenhez dos embriões NTEC e FIV (33,8% e 27,5% vs 49,2% e 52,9% respectivamente). Estas diferenças se mantiveram em relação às taxas de nascimento (6,8%, 15,0%, 34,3% e 49,0%). As perdas após os 90 dias foram de 43,7% para os fetos

NTSC adulto, 33,3% NTSC fetal, 4,3% NTEC e 0% FIV. A sobrevivência pós-natal foi de 66,6% no grupo NTSC adulto e entre 80 e 83% nos demais grupos. Desta maneira, fica claro que as taxas de desenvolvimento *in vivo* são menores para embriões produzidos a partir de células somáticas adultas do que para células fetais e embrionárias (Heyman *et al.*, 2002).

2.4.2 Tecido de Origem da Célula Doadora

Células oriundas de diferentes tipos de tecido podem ser utilizadas na clonagem como doadoras de núcleo. Dentre elas, podemos citar as células epiteliais da glândula mamária, células do *cumulus*, do oviduto, leucócitos, da granulosa, do fígado, do útero, dos músculos, de Sertoli, linfócitos T e B, neurônios e fibroblastos (Brem e Kühholzer, 2002; Miyoshi *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2007).

Alguns tipos celulares parecem ser mais facilmente reprogramados do que outros, entretanto, a comparação entre os trabalhos que utilizam diferentes tipos de células é muito complicada devido aos métodos utilizados serem diferentes e a eficiência geral da técnica que é muito baixa (Miyoshi *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2007). De um modo geral, acredita-se que a eficiência da clonagem é inversamente proporcional ao estado de diferenciação da célula somática. Entretanto, estudo utilizando células da linhagem muscular em diferentes estágios de diferenciação, não apresentaram diferença nas taxas de prenhez e de sobrevivência pós-natal (Green *et al.*, 2007). Desta maneira, o potencial de reprogramação da célula somática pode ser dependente do método estatístico utilizado para realizar a comparação e qualquer afirmação em relação ao melhor tipo celular é difícil de ser realizada (Campbell *et al.*, 2007).

2.4.3 Linhagens Celulares

Linhagens celulares de um mesmo animal e tecido podem apresentar diferenças na eficiência de produção de clones (Miyoshi *et al.*, 2003). Um importante parâmetro para a escolha da linhagem celular é a sua capacidade de promover o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto após sua fusão com o citoplasma receptor. Entretanto, não existem evidências que estes resultados *in vitro* se reflitam nos resultados *in vivo*. Powell *et al.* (2004) compararam células doadoras de diferentes linhagens e observaram que as células das linhagens que proporcionaram melhores taxas de desenvolvimento *in vitro* (29,7% de blastocistos de 366 embriões cultivados), produziram apenas 3% de prenhez aos 56 dias e nenhum nascimento após a transferência de 38 embriões,

enquanto que células que produziram resultados menores de desenvolvimento *in vitro* (22,1% de blastocistos de 1228 embriões cultivados) proporcionaram 22% de prenhez e 4 nascimentos de 97 embriões transferidos. Apesar da avaliação *in vivo* ser a mais fiel para que se possa avaliar a capacidade de célula doadora em ser reprogramada de maneira correta, a baixa eficiência da técnica exige a manutenção de um grande grupo de receptoras, o que dificulta este tipo de análise.

2.4.4 Tempo de Cultivo da Célula Doadora

O cultivo de células somáticas durante longos períodos pode alterar aspectos importantes do ponto de vista fisiológico, genético e epigenético, tais como marcadores celulares, ploidia, estabilidade genômica, histonas e o grau de diferenciação celular (Campbell *et al.*, 2007). Entretanto, animais saudáveis podem ser produzidos com células em diferentes números de passagens (5-15) sem modificação nos problemas pré- e pós-natais observados (Kubota *et al.*, 2000).

Células cultivadas durante longos períodos, mais de 30 passagens, antes da utilização para NT, promovem maiores índices de apoptoses nos embriões gerados, apesar de não comprometer as taxas de desenvolvimento embrionário até blastocistos (Jang *et al.*, 2004).

2.4.5 Sistema de Cultivo da Célula Doadora

Células somáticas cultivadas *in vitro* sob diferentes condições proporcionam diferentes taxas de desenvolvimento embrionário após a transferência nuclear. Powel *et al.* (2004) analisaram o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto de 4007 complexos reconstruídos com fibroblastos originados de fetos diferentes, produzidos a partir de vários tecidos e cultivados sob diferentes meios de cultivos, concentração de soro e concentração de oxigênio. Quando compararam Meio Mínimo Essencial modificado por Dulbecco (DMEM) e MEM como meios de cultivo dos fibroblastos fetais, os autores observaram que para células obtidas de dois fetos, não houve diferença significativa sobre o desenvolvimento até blastocisto, entretanto, para outro feto o meio MEM proporcionou melhores resultados. Em relação ao tecido, fibroblastos oriundo de músculo produziram maiores taxas de blastocistos quando cultivados em MEM do que em DMEM. Entretanto, o oposto foi observado com fibroblastos oriundo de pulmão. A concentração atmosférica de O₂ durante o cultivo dos fibroblastos doadores também influenciou as taxas de desenvolvimento *in vitro* de maneira distinta dependendo do feto

que as originou. Para dois fetos a redução do O₂ atmosférico proporcionou uma redução significativa da taxa de blastocisto (de 38,1% para 16,0% e 26,0% para 3,5%). Enquanto para fibroblastos oriundos de outro feto a concentração do oxigênio atmosférico não modificou o desenvolvimento embrionário (27,7% e 24,3%) (Powell *et al.*, 2004).

2.4.6 Fase do Ciclo Celular para Clonagem

Células doadoras estacionadas entre as fases G0/G1 do ciclo celular têm sido freqüentemente utilizadas para produção de clones. A sincronização do ciclo celular, usualmente, é realizada através da redução da concentração do soro no meio de cultivo de 10% para 0,5%, ou pela inibição da divisão celular pelo contato em células confluentes (Miyoshi *et al.*, 2003). Entretanto, células não quiescentes também podem ser utilizadas como doadoras de núcleo com eficiência *in vitro* similar (Kasinathan *et al.*, 2001) e com a produção de nascidos a termo (Cibelli *et al.*, 1998).

Powell *et al.* (2004) utilizaram, para NT, fibroblastos de fetos entre 62 e 107 dias de gestação, cultivados com e sem redução do soro na reconstrução de 1068 embriões e observaram que células oriundas de três fetos diferentes proporcionaram o desenvolvimento embrionário até blastocisto. Para um dos fetos, a redução do soro de 10% para 0,5%, seis dias antes da utilização, não modificou significativamente as taxas de desenvolvimento até blastocisto (18,9% vs 22,3%). Para células originadas de outro feto, a redução do soro promoveu uma melhora significativa (19,6% vs 39,9%) e para o terceiro a redução do soro promoveu uma redução nas taxas de blastocistos (19,3% vs 12,6%). Este resultado controverso evidencia que fatores individuais determinam a resposta à sincronização do ciclo celular.

2.5 Fusão e Heteroplasmia

A transferência nuclear envolve a fusão das membranas citoplasmáticas da célula doadora do núcleo e do citoplasma receptor, ocasionando a ocorrência de heteroplasmia (Do *et al.*, 2002).

O estado de homoplasmia existe quando todas as cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) dentro das células e dos tecidos são idênticas entre si; a coexistência de duas variantes de mtDNA resulta na heteroplasmia (St John *et al.*, 2004).

A homogeneidade do mtDNA é mantida na linhagem de células germinativas da fêmea devido à eliminação das mitocôndrias do espermatozóides logo após a fecundação e também devido à manutenção de baixa atividade metabólica durante a

oogênese, reduzindo a ocorrência de mutações *de novo* no mtDNA. Entretanto, sempre que ocorrem novas mutações e duas ou mais variantes coexistem na célula (heteroplasmia), o gargalo genético da linhagem germinativa feminina irá a favor das organelas progenitoras, retornando à homoplasmia. A heteroplasmia do mtDNA pode acarretar uma série de desordens sistêmicas em humanos, causando doenças neurológicas e neuromusculares. Entretanto, a heteroplasmia não está necessariamente associada a doenças porque frequentemente ocorre de forma silenciosa na natureza (Smith *et al.*, 2005).

Não existem evidências claras de que a heteroplasmia causada pela transferência nuclear seja prejudicial ao desenvolvimento. A maioria dos clones de células somáticas apresenta muito pouco ou nenhum halotipo mitocondrial derivado da célula doadora (Meirelles *et al.*, 2001). Entretanto, uma pequena fração dos clones apresenta um favorecimento da replicação do mtDNA derivado da célula doadora (Chen *et al.*, 2002; Do *et al.*, 2002; Steinborn *et al.*, 2002).

O mecanismo que leva a altas taxas de mtDNA derivado da célula doadora em alguns animais não está claro e parece que só alguns halotipos de mtDNA são replicados, preferencialmente, durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Acredita-se que fatores de transcrição e ou replicação, codificados no núcleo, podem ser incompatíveis ou ineficientes com alguns halotipos da mtDNA, favorecendo a sobrevivência da organela própria (Smith *et al.*, 2005).

Normalmente, a replicação do mtDNA não ocorre antes do estágio de blastocisto. Antes deste estágio, as mitocôndrias existentes apenas são divididas de acordo com a divisão do citoplasma, durante as clivagens sucessivas. Desta maneira, as mitocôndrias oriundas da célula doadora podem ficar distribuídas de maneira heterogênea entre os blastômeros formados (St John *et al.*, 2004).

O núcleo codifica fatores nucleares que controlam a transcrição/replicação mitocondrial (Lloyd *et al.*, 2006). Em alguns casos, embriões clones expressam fatores nucleares que controlam a transcrição/replicação mitocondrial de maneira anormal, devido a continuada expressão de fatores de replicação do mtDNA pela célula doadora no período pré-implantação. Isto pode desencadear a prematura replicação do mtDNA da célula doadora antes do estágio de blastocisto (Bowles *et al.*, 2007).

2.6 Ativação

2.6.1 Ativação pela Fecundação

Naturalmente, os oócitos em MII são ativados pelo processo da fecundação, dando o prosseguimento aos eventos do final da meiose.

A ativação do oócito compreende uma seqüência de eventos celulares, que podem ser classificados em eventos iniciais e tardios (Xu *et al.*, 1994). Os eventos iniciais incluem a oscilação do Ca^{+2} intracelular, exocitose dos grânulos corticais (bloqueio à poliespermia), recrutamento do mRNA materno, retomada da meiose e extrusão do segundo corpúsculo polar (Fissore *et al.*, 2002b). Os eventos tardios incluem a formação de pró-núcleos, início da síntese de DNA e a primeira clivagem (Ben-Yosef e Shalgi, 1998).

O sinal celular necessário para o início do processo da ativação é a oscilação do Ca^{+2} intracelular desencadeado pelo espermatozóide. O aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular é determinado pela atividade da enzima fosfolipase C (PLC). A PLC catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) gerando duas moléculas sinalizadoras o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O DAG participa de várias vias de sinalização celular incluindo a ativação da proteíno-quinase C (PKC). O IP_3 liga-se ao receptor IP_3R localizado na membrana do retículo endoplasmático que armazena o Ca^{+2} . O IP_3R é uma estrutura tetramérica que, quando ligado ao IP_3 , funciona como um canal de Ca^{+2} , liberando-o para o citosol. O IP_3 é rapidamente desfosforilado formando IP_2 ou fosforilado formando IP_4 . Além disto, o Ca^{+2} que entra no citosol é bombeado para fora da célula (Alberts *et al.*, 2004). Desta maneira, a oscilação da concentração de Ca^{+2} dentro do oócito após a fecundação é desencadeada pela atividade da PLC ζ , presente no espermatozóide (Saunders *et al.*, 2002).

Antes da fecundação, o oócito permanece estagnado em metáfase II (MII), devido à presença ativa do MPF que mantém o fuso acromático, a cromatina condensada e previne a nova síntese do envelope nuclear. Esta atividade do MPF é mantida pela presença de CSF, que previne a degradação da Ciclina B1. Após a ativação, a elevação de Ca^{+2} intracelular desestabiliza o CSF, tendo em vista que é sensível ao Ca^{+2} . Desta maneira, a Ciclina B1 passa a ser degradada e com a diminuição do MPF o oócito fecundado retoma a meiose eliminando o segundo corpúsculo polar o que possibilita a formação dos pronúcleos (Williams, 2002).

Algumas horas após a fecundação, a oscilação do Ca^{+2} diminui e o zigoto inicia seu primeiro ciclo mitótico que apresenta algumas particularidades. Os pró-núcleos masculino e feminino são formados e a síntese de DNA se inicia (fase S). Sob controle do citoesqueleto, os dois pró-núcleos migram para o centro e as membranas nucleares se rompem e os cromossomos já duplicados iniciam a preparação da primeira clivagem (Williams, 2002).

2.6.2 Ativação Artificial na Transferência Nuclear

2.6.2.1 Ativação Partenogenética

O desenvolvimento até blastocisto do gameta feminino sem a contribuição do gameta masculino pode ser definido como partenogênese (Alberio *et al.*, 2001). A partenogênese tem sido usada como modelo para o estudo dos eventos bioquímicos e morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial. Este modelo vem sendo empregado para a otimização de metodologias empregadas na transferência nuclear, como protocolos de ativação, sem a necessidade da realização do complexo procedimento de transferência nuclear (Hosseini *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Além disto, oócitos ativados partenogeneticamente são freqüentemente utilizados em experimentos de clonagem como controles das condições de manipulação, tais como meios de manutenção, temperatura ambiente, metodologia e sistema de ativação, sistema de cultivo e qualidade intrínseca dos oócitos (Shen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

2.6.2.2 Ativação de Oócitos Reconstruídos

A ativação química vem sendo proposta para mimetizar os efeitos bioquímicos e morfológicos que são desencadeados naturalmente pelo espermatozóide durante a fecundação (Campbell *et al.*, 2007). Atualmente, os protocolos para a ativação de oócitos bovinos reconstruídos comumente usam componentes mobilizadores do Ca^{+2} , como tratamento primário durante alguns minutos para gerar uma oscilação transitória do Ca^{+2} , seguido por um tratamento secundário durante algumas horas para inativar o MPF e/ou CSF conduzindo a retomada da meiose e a entrada no primeiro ciclo celular embrionário (Hosseini *et al.*, 2007). A oscilação do cálcio intracitoplasmático é induzida pela exposição ao Cálcio Ionóforo A23187 que promove a liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares e também facilita o influxo de Ca^{+2} extracelular. A ionomicina é outro potente ionóforo do Ca^{+2} , freqüentemente usada em protocolos da ativação na

transferência nuclear, que mobiliza o Ca^{+2} pela depleção dos estoques intracelulares. A ativação induzida pelo etanol 7% induz a formação de IP_3 e promove um influxo de Ca^{+2} extracelular (Alberio *et al.*, 2001). Enquanto estes químicos induzem um único aumento de Ca^{+2} citosólico, o cloreto de estrôncio, que vem sendo empregado mais recentemente, induz múltiplas oscilações de Ca^{+2} , provavelmente pela alteração na bomba de Ca^{+2} e pela liberação dos estoques intracelulares. Em associação com a ionomicina, o cloreto de estrôncio dispensa a utilização de inibidores da síntese protéica ou de proteíno-quinases (Yamazaki *et al.*, 2005).

O tratamento secundário dos oócitos reconstruídos tem por objetivo diminuir a atividade do MPF. A concentração da Ciclina B oscila durante o ciclo celular e o nível de atividade do MPF depende da síntese e degradação da Ciclina B (Alberio *et al.*, 2001). Inibidores da síntese protéica, como a ciclohexamida, usualmente, restringem a síntese e a re-acumulação da Ciclina B, bloqueando a re-síntese do MPF ativo (Wang *et al.*, 2007). Entretanto, a ciclohexamida não diminui apenas as proteínas que mantém a atividade do MPF, mas também inibe a síntese de inúmeras outras proteínas essenciais ao oócito (Alberio *et al.*, 2001).

A inibição das proteíno-quinases tais como a MAPK pode ser obtido com o uso de 6-dimetilaminopurina (6DMAP) e também promove a ativação do oócito de maneira mais específica (Wang *et al.*, 2007). Entretanto, esta inibição não é específica para as enzimas envolvidas na atividade do MPF, e também interfere na atividade de inúmeras quinases envolvidas em outras funções celulares (Alberio *et al.*, 2001).

Para os protocolos de ativação utilizados atualmente, o momento da ativação também influencia o desenvolvimento embrionário. Após a transferência do núcleo diferenciado para o oócito MII enucleado, ocorre a quebra do envelope nuclear e a cromatina é exposta ao citoplasma para que o núcleo possa ser reprogramado, eventos mediados por altos níveis de MPF (Aston *et al.*, 2006). Assim sendo, é necessário o contato do núcleo doador com o citoplasma do oócito receptor por um período antes que se realize a ativação. Melhores taxas de desenvolvimento *in vitro* podem ser obtidas se a ativação for realizada algumas horas após a fusão, quando comparada a ativação simultânea a fusão (Shen *et al.*, 2007). Entretanto, este contato por longos períodos pode ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário, sendo que o intervalo entre a fusão e a ativação de aproximadamente 1 a 2,5 horas parece proporcionar os melhores resultados (Aston *et al.*, 2006).

2.7 Reprogramação e Desenvolvimento Embrionário

2.7.1 Desenvolvimento Embrionário Inicial após a Fecundação

A formação dos pró-núcleos funcionais é vital para muitas funções celulares no zigoto e no embrião. Cada pró-núcleo contém os cromossomos masculino e feminino na forma descondensada e envoltos pela dupla membrana nuclear fenestrada por complexos de poros nucleares (NPCs). Entre a cromatina e a membrana nuclear interna, a rede de proteínas dos filamentos intermediários, chamada de lamininas nucleares, constitui a lâmina nuclear. A lâmina contribui para a arquitetura nuclear e também está envolvida com a replicação e transcrição do DNA (Alberts *et al.*, 2004).

O núcleo é uma organela altamente dinâmica, como pode ser observado pelas mudanças morfológicas e bioquímicas que o núcleo do espermatozóide passa durante a fertilização. No citoplasma do oócito, o espermatozóide, que está inativo e altamente compactado, é desmontado e remodelado em um grande pró-núcleo masculino apto à replicação. Concomitantemente, ocorre a formação do pró-núcleo feminino, a partir da cromatina condensada em telófase II, no momento da ativação do oócito. As moléculas do citoplasma do oócito são igualmente importantes para a formação do pró-núcleo masculino como do feminino. O desenvolvimento do pró-núcleo a partir do DNA do espermatozóide requer histonas, lâmina nuclear e nucleoporinas maternas (Fissore *et al.*, 2002b).

De maneira semelhante, a remodelagem de um núcleo exógeno e diferenciado em um oócito em metáfase II requer a desmontagem do núcleo transplantado e reconstrução do novo núcleo, evento envolvido na reprogramação do núcleo doador para o estado de totipotência. A desmontagem nuclear no citoplasma meiótico envolve a quebra do envelope nuclear e a condensação da cromatina que resulta na inibição da síntese de DNA no núcleo. O grau de desmontagem do envelope nuclear está relacionado com o nível de atividade do MPF no oócito. Estes eventos são seguidos por um “apagamento” das modificações epigenéticas do DNA incluindo mudanças na acetilação das histonas e metilação do DNA (Aston *et al.*, 2006). A transcrição de RNA ribossomal também é diminuída ou inibida, fenômeno associado com as mudanças na estrutura do nucléolo, local onde ocorre a formação dos ribossomos essenciais para a síntese protéica (Kanka *et al.*, 1996). O nucléolo, presente no núcleo da célula transferida, é desprogramado, parando de sintetizar ribossomos. A formação do nucléolo em embriões reconstruídos está associada com a reativação da transcrição de rDNA e pode ser considerada como

um marcador da ativação do genoma embrionário. Entretanto, embriões produzidos por transferência nuclear podem apresentar alterações no padrão morfológico e temporal de reorganização nucleolar (Maddox-Hyttel *et al.*, 2007). Os transcritos maternos são os responsáveis pelos eventos iniciais do desenvolvimento embrionário, e a reprogramação nuclear deve ser mediada por fatores do citoplasma do oócito (Aston *et al.*, 2006).

Em contraste, o núcleo transplantado para o citoplasma em fase S conserva as características da interfase, como a manutenção da cromatina descondensada dentro do envelope nuclear intacto e virtualmente com a síntese ininterrupta de DNA. Quando a transferência ocorre entre telófase e estágio de pró-núcleo, ocorre o comprometimento de estruturas nucleares, a formação de bolhas no envelope nuclear e a cromatina não é significativamente condensada ou descondensada. O contato direto da cromatina com o citoplasma do oócito (como consequência da quebra do envelope nuclear) parece ser necessário para que a completa remodelagem ocorra (Fissore *et al.*, 2002b).

Durante o processo de fertilização natural, os genomas parentais estão em diferentes fases do ciclo celular, com marcas epigenéticas e organização da cromatina muito distintas. O genoma paterno é entregue pelo espermatozóide e uma única cópia, densamente compactado, com maior quantidade de protaminas do que de histonas enquanto o genoma materno, com duas cópias, está estacionado em metáfase II e empacotado com histonas. Após a fecundação, as protaminas da cromatina do espermatozóide são rapidamente substituídas por histonas enquanto o genoma materno completa a meiose. As histonas H3 e H4 paternas são mais acetiladas do que as presentes na cromatina materna. Durante a formação do pró-núcleo masculino, antes de iniciar a replicação do DNA, ocorre a demetilação do DNA paterno, exceto em algumas regiões como os genes *imprinting* (Morgan *et al.*, 2005).

2.7.2 Memória Celular e Reprogramação das Células Transferidas para Oócitos Eucleados em MII

Todas as células de um organismo contêm o mesmo DNA, ainda que desempenhem papéis diferentes. Estas diferenças podem ser atribuídas a diferentes padrões de proteínas expressadas em cada tipo celular, que são estabelecidas relativamente cedo no desenvolvimento e mantidas por inúmeras divisões por toda a vida, o que podemos chamar de como memória celular (Eilertsen *et al.*, 2007).

A memória celular é regulada por mecanismos epigenéticos que garantem características transmissíveis das células e diferenças funcionais entre tipos celulares, sem alterar a seqüência de DNA. Estes mecanismos epigenéticos alteram a cromatina (DNA e proteínas associadas) de maneira que modificam a disponibilidade de genes para fatores de transcrição requeridos para a sua expressão (Eilertsen *et al.*, 2007).

A memória celular pode ser classificada em dois tipos, memória aparente e memória intrínseca, igualmente importantes, mas com funções biológicas diferentes em células mamíferas. A memória aparente requer um mecanismo de sinalização para sua persistência, e pode ser usada temporariamente para silenciar genes que requerem a re-expressão mais tarde durante a diferenciação ou em resposta a um estímulo ambiental. A memória intrínseca persiste na ausência de sinais e aparece para silenciar retrovirus e transposons durante o desenvolvimento e diferenciação ou ainda oncogenes que induzem a transformação de certos tipos celulares (Feng *et al.*, 2006).

Os mecanismos epigenéticos que modulam a memória celular envolvem a acetilação/deacetilação e metilação de histonas, o grupo de proteínas *Polycomb* (PcG) e a metilação do DNA (Feng *et al.*, 2006).

A adição de grupamentos acetil e metil nos resíduos de lisina das histonas H2A, H2B, H3 e H4 alteram a acessibilidade de genes para a transcrição. A acetilação é realizada pela enzima Histona Acetil Transferase (HAT) e confere característica de permissibilidade aos genes controlados. A deacetilação das histonas é realizada pela Histona Deacetilase (HDAC) e está relacionada com a repressão de genes. A metilação das histonas é realizada pela Histona Metil Transferase (HMT) e está associada tanto à repressão quanto à ativação de genes dependendo de qual resíduo de lisina é metilado e a quantidade de lisinas adicionadas (mono, di ou trimetilado) (Eilertsen *et al.*, 2007).

As proteínas do grupo *Polycomb* mantêm o estado reprimido dos gene *hox*. Estes genes homeóticos estão relacionados com a identidade segmentar no desenvolvimento embrionário, são inicialmente reprimidos por repressores transcripcionais que se ligam ao DNA. Proteínas PcG são subsequentemente recrutadas ao sítio e formam complexo repressor *Polycomb* (PRC) que modifica mais ainda a cromatina para manter o silenciamento do gene (Eilertsen *et al.*, 2007).

A metilação do DNA está associada com o silenciamento de transgenes, inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, silenciamento de elementos

genéticos móveis e regulação do desenvolvimento de alguns genes tecido-específico (Feng *et al.*, 2006). A adição do grupamento metil na posição 5' do anel da citosina é realizada pela DNA metil-transferase (Dnmt). Os padrões de metilação são diferentes em cada tipo de célula e conferem a identidade do tipo celular, estando diretamente relacionado com a estrutura da cromatina. A metilação suporta a memória intrínseca das células silenciando ou reprimindo genes, entretanto a metilação pode ser modificada por sinais ambientais. De maneira geral, o DNA metilado está relacionado com a inatividade de genes, enquanto o DNA não metilado com a atividade de genes (Eilertsen *et al.*, 2007).

Em embriões bovinos, a demetilação ocorre rapidamente após a fecundação e a metilação *de novo* inicia entre 8- e 16- células, concomitante com a ativação principal do genoma embrionário, sendo que a metilação das células do botão embrionário é maior do que as células do trofooctoderma (Figura 4). Entretanto, nos embriões clones, foi observado que a metilação *de novo* inicia no estágio de 4-células e as células do trofooctoderma aparecem hipermetiladas (Yang *et al.*, 2007b).

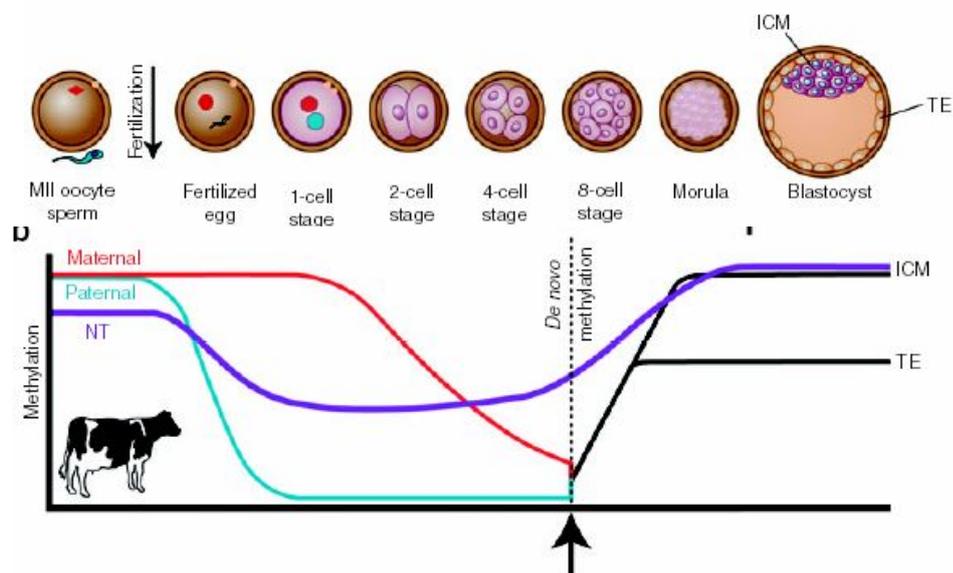


Figura 4. Padrão de metilação do DNA no desenvolvimento embrionário de embriões bovinos. Adaptado de Yang *et al.* (2007b).

O *imprinting* genômico pode ser definido como o mecanismo epigenético que resulta no tratamento diferencial de seqüência de genes idênticos pela maquinaria de transcrição celular, devido a sua origem materna ou paterna (Regha *et al.*, 2007). A metilação do DNA em ilhas CpG de genes *imprinting* é que determina esta expressão preferencial de genes de acordo com sua origem. A maioria dos genes *imprinting* está

relacionada com o crescimento e desenvolvimento fetal e ambos os genomas (materno e paterno) são necessários para que ocorra o desenvolvimento normal (Yang *et al.*, 2007b).

A inativação do cromossomo X, bem como a manutenção do estado inativo ocorre devido a mecanismos epigenéticos. A inativação de um cromossomo X em fêmeas é necessária para que a expressão de genes *X-linked* ocorra de maneira semelhante em machos e fêmeas. Durante o desenvolvimento embrionário inicial estes embriões apresentam os dois cromossomos X ativos. Entretanto, no estágio de blastocisto, ocorre a inativação de um destes cromossomos. A inativação ocorre de maneira diferencial entre as células do trofoectoderma e do botão embrionário. As células do botão embrionário apresentam a inativação ao acaso, ou seja, em uma célula é inativado o cromossomo paterno e em outra o cromossomo materno. Entretanto, as células do trofoectoderma, apresentam a inativação preferencial do cromossomo paterno (Yang *et al.*, 2007b). Em embriões clones, muitas vezes, estes padrões de inativação do cromossomo X são alterados (Xue *et al.*, 2002). Na Figura 5 podemos observar uma representação esquemática da inativação do cromossomo X em embriões normais e clones.

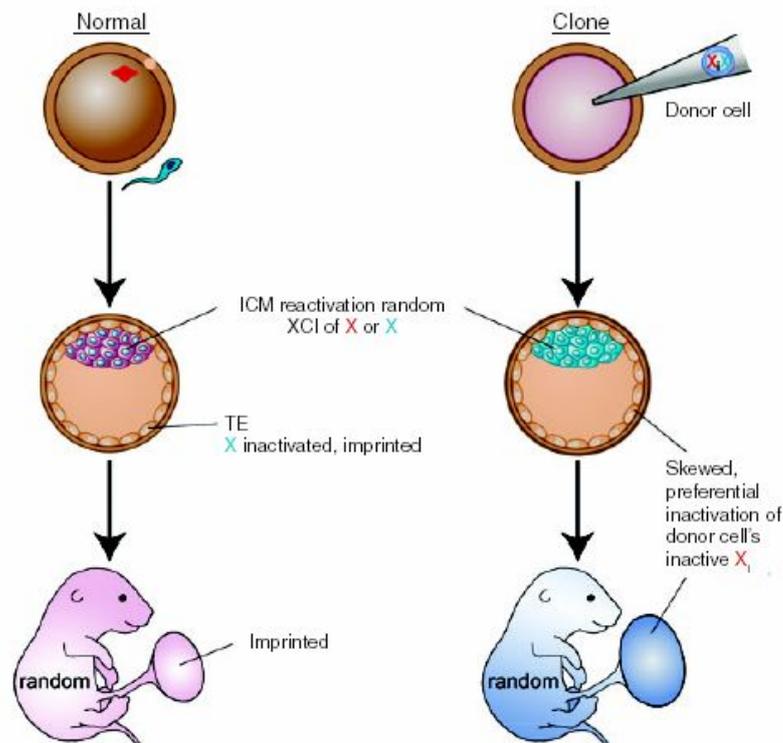


Figura 5. Representação esquemática da inativação do cromossomo X em embriões clones comparado aos normais. Adaptado de Yang *et al.* (2007b).

2.8 Criopreservação de Embriões Clones

A vitrificação de embriões é uma técnica que vem sendo utilizada para embriões bovinos produzidos *in vitro*, como alternativa ao congelamento convencional proporcionando melhores resultados para estes embriões (Vieira *et al.*, 2007). Estes embriões se diferenciam dos embriões produzidos *in vivo* por inúmeras características, dentre elas a criotolerância (Dobrinsky, 2002).

O sistema de cultivo dos embriões fecundados *in vitro* influencia diretamente a sua sobrevivência durante a criopreservação (Abe *et al.*, 2002). Embriões NT e FIV, usualmente, são cultivados e criopreservados em condições muito semelhantes, entretanto, o comportamento *in vitro* dos embriões FIV e NT parecem ser distintos (Nguyen *et al.*, 2000). Estes autores obtiveram melhores resultados *in vitro* com embriões NT do que com embriões FIV utilizando o mesmo protocolo de vitrificação em palhetas de 0,25 mL. Por outro lado, outros autores, obtiveram taxas de eclosão inferiores em embriões NT (Taniguchi *et al.*, 2007). Desta maneira, protocolos utilizados para embriões FIV podem ser empregados para embriões NT, entretanto alguns ajustes podem ser necessários, tendo em vista que o comportamento destes embriões é diferente dos embriões FIV.

O primeiro clone nascido a partir de embriões clones vitrificados foi produzido pela técnica de *handmade cloning* (HMC), que produz embriões sem zona pelúcida, e vitrificados pela tecnologia de OPS (*open-pulled straw*). Os autores obtiveram o nascimento de um terneiro a partir de 53 embriões transferidos para 14 receptoras (Tecirlioglu *et al.*, 2003). O primeiro relato de nascimento de produto obtido por micromanipulação foi realizado por Gong *et al.* (2004). Eles obtiveram o nascimento de um clone transgênico após a transferência de 9 embriões produzidos por micromanipulação e vitrificados (Gong *et al.*, 2004).

De outro lado, com outro trabalho, boas taxas de desenvolvimento *in vitro* (77% de sobrevivência) após a vitrificação de embriões clones produzidos por micromanipulação foram obtidas, mas não conseguiram gestação acima de 60 dias após a transferência de 25 embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados selecionados após cultivo durante 24 h para 14 receptoras (Laowtammathron *et al.*, 2005).

2.9 Desenvolvimento *in vivo*

O desenvolvimento *in vivo* dos embriões clones representa o maior obstáculo para que a técnica de transferência nuclear possa ser utilizada comercialmente (Heyman *et al.*, 2002; Miyoshi *et al.*, 2003; Thibault, 2003; Wells, 2005; Batchelder *et al.*, 2007b). Em laboratórios que realizam atividades de fecundação *in vitro* e clonagem com eficiência, as taxas de produção de blastocistos tendem a ser similares pelas duas técnicas, entretanto, as perdas durante a gestação são muito maiores nos embriões NT (Heyman *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2004). As taxas iniciais de prenhez de embriões clones tendem a ser próximas daquelas observadas com embriões FIV (Wells, 2005), entretanto, as perdas durante a gestação chegam a 75% (Thibault, 2003).

Apesar de alguns trabalhos relatarem altas taxas de sobrevivência de pequeno número de clones (10/10 e 8/9) (Wells *et al.*, 1999; Urakawa *et al.*, 2004), diversos grupos de pesquisa e empresas comerciais relatam a baixa taxa de nascimentos de clones a partir da transferência de grande número de embriões. Heyman *et al.* (2002) relataram taxa de nascimento de 6,8% de clones ao longo de 3 anos de trabalho. Em outro relato foi observado o nascimento de apenas 5,4 % dos 2170 embriões transferidos (Pace *et al.*, 2002). Powel *et al.* (2004) relataram o nascimento de 8 animais nascidos vivos de 330 embriões transferido (2,4%). Outro grupo transferiu 988 embriões clones obtendo 13% de nascimentos, significativamente inferior aos resultados obtidos com embriões FIV (30-45%) (Wells, 2005). Panarace *et al.* (2007) transferiram 3374 embriões clones e apenas 9% deles nasceram vivos.

Uma das principais causas de mortalidade em clones é a alta incidência de *large offspring syndrome* (LOS). Esta síndrome está relacionada com desenvolvimento anormal da placenta com hidroalantóide e alteração nos placentônios (número reduzido, tamanho aumentado e edematosos) e com o excesso de tamanho fetal com assincronia de crescimento dos órgãos (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004).

Além das elevadas perdas durante toda a gestação, os clones que nascem apresentam uma elevada taxa de mortalidade depois do nascimento (23 a 42%), causada por diversas patologias (Heyman *et al.*, 2002; Pace *et al.*, 2002; Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Powell *et al.*, 2004; Wells, 2005; Panarace *et al.*, 2007). A intervenção, geralmente, é necessária para que ocorra o parto, pois as gestações de clones tendem a ser prolongadas e com peso ao nascer 25% maior do que o normal (Wells, 2005). A placentação usualmente é alterada, com diminuição do número e aumento do tamanho

dos placentônios (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002; Batchelder *et al.*, 2007b). Hidroalantóide é observado em cerca de 25% das gestações acima de 120 dias, patologia que tem prevalência de 0,07% em gestações produzidas por inseminação artificial (Wells, 2005). Muitos dos animais apresentam alterações metabólicas neonatais, provavelmente, devido às alterações placentárias (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002; Batchelder *et al.*, 2007a).

As alterações observadas nos clones são muito variadas e incluem problemas respiratórios (deficiência de surfactante, aspiração de mecônio, pneumonia), hiper/hipotermia, espessamento do cordão umbilical e onfaloflebite, alterações músculo esqueléticas (contração de tendões flexores, artrites) úraco persistente, maior susceptibilidade a infecções, alterações morfológicas e funcionais renais, esteatose hepática, fraturas vertebrais devido a distocia, alterações nas concentrações sanguíneas de glicose, frutose e lactato, distúrbios neurológicos, distúrbios digestivos (gastrites e enterites) e distúrbios circulatórios (hipertensão pulmonar). A frequência do aparecimento de certas patologias é variada de acordo com o grupo de pesquisa (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002; Hill e Chavatte-Palmer, 2002; Pace *et al.*, 2002; Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Wells, 2005; Batchelder *et al.*, 2007b; Batchelder *et al.*, 2007a; Panarace *et al.*, 2007). Os problemas apresentados nos clones tendem a ser os mesmo apresentados nos animais não clones, entretanto com uma frequência muito maior, e algumas vezes com mais de uma patologia associada.

A maior parte dos clones nascidos (75%) exige cuidados neonatais intensivos que incluem monitoramento dos parâmetros clínicos como temperatura, frequência cardíaca frequência respiratória e de amostras sangue arterial e venoso do hematócrito, proteínas totais, IgG, pO₂, pCO₂, pH, glicose, lactato, Ca⁺², Mg⁺², Cl⁻, K⁺ e Na⁺. Para a estabilização clínica dos animais, os procedimentos usuais incluem a oxigenioterapia nasal, administração de colostro através de sonda, alimentação parenteral, administração de glicose, antibioticoterapia, uso de antipiréticos e diuréticos. A administração de surfactantes pulmonares e de broncodilatadores, bem como o uso da pressão positiva de oxigênio também podem ser recomendados para a melhoria do quadro respiratório (Hill e Chavatte-Palmer, 2002). Alguns procedimentos cirúrgicos podem ser necessários especialmente nos casos de úraco persistente e espessamento dos vasos umbilicais (Hill e Chavatte-Palmer, 2002; Panarace *et al.*, 2007).

Neste contexto, a célula doadora tem papel fundamental no sucesso da clonagem, e alguns trabalhos relatam que algumas linhagens celulares proporcionam melhores resultados *in vivo* do que outras, assim como algumas linhagens celulares são ineficientes na produção de animais nascidos, entretanto não existe correlação entre o desenvolvimento *in vitro* e o *in vivo*, o que dificulta a seleção das linhagens (Miyoshi *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2004).

2.10 Transferência Nuclear de Célula Somática Interespécie

Outra aplicação da transferência nuclear é a utilização de oócitos de espécies domésticas, em que a maturação e o cultivo *in vitro* apresentam resultados satisfatórios, como citoplasma receptor para transferência nuclear de células somáticas interespecie (NTSCi). Os objetivos destes trabalhos são a utilização do citoplasma de espécies de fácil obtenção e manipulação para a recuperação de espécies ameaçadas de extinção, bem como, para a produção de clones de espécies domésticas, cujos oócitos apresentam baixas taxas de recuperação, maturação e/ou sobrevivência após a enucleação.

Neste sentido, oócitos de bovinos (*Bos taurus*), ovinos (*Ovis aries*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), gatos domésticos (*Felis catus*) e cães domésticos (*Canis familiaris*) vêm sendo utilizados como citoplasma receptor após a enucleação para a NTSCi.

Oócitos de espécies do mesmo gênero foram capazes de suportar o desenvolvimento *in vivo* e proporcionar o nascimento de produtos com a NTSCi. O primeiro produto viável produzido por NTSCi foi obtido com a utilização de oócitos ovinos na produção de clones de *muflon* ou carneiro montês da Europa (*Ovis orientalis musimon*) (Loi *et al.*, 2001). Oócitos bovinos proporcionaram o desenvolvimento *in vivo* até o final da gestação e também a termo de *gaur* ou bisão indiano (*Bos gaurus*) (Lanza *et al.*, 2000; Vogel, 2001) e também do *banteng* ou boi de Java (*Bos javanicus*) (Janssen *et al.*, 2004). Oócitos de gato doméstico (*Felis catus*) foram utilizados na NTSCi com células de gato selvagem africano (*Felis lybica*) produzindo o nascimento de filhotes saudáveis com a técnica de NTSCi (Gómez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2005). Oócitos de caninos domésticos foram utilizados para produzir embriões de lobo cinzento (*Canis lupus*), que após transferência proporcionaram o nascimento de filhotes saudáveis (Kim *et al.*, 2007).

A utilização de espécies mais distantes também foi capaz de proporcionar o desenvolvimento inicial *in vivo*. Oócitos de coelha (*Oryctolagus cuniculus*) foram utilizados como citoplasma receptor para células de gato doméstico (*Felis catus*) e de panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) e proporcionaram o desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto de 5,2% dos embriões gato-coelho no dia 7 e de 18,5% dos embriões panda-coelho no Dia 5. Após a transferência de 2300 embriões panda-coelho para 100 coelhas receptoras não observaram nenhuma prenhez. Na tentativa de utilizar uma espécie mais próxima como receptora, foram transferidos 10 embriões panda-coelho junto com 10 embriões gato-coelho para cada uma das 21 gatas receptoras. Destas 19 apresentaram estro entre 35 e 48 dias após a transferência dos embriões, e duas morreram aos 21 e 22 dias. Na necropsia, uma delas apresentava 6 fetos distribuídos nos dois cornos uterinos e vários corpos lúteos em ambos os ovários. Na análise do DNA dos fetos encontrados, dois deles apresentaram resultados idênticos ao da célula doadora do panda (Chen *et al.*, 2002). Outros autores utilizaram células do gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*) na produção de embriões interespecie utilizando oócitos de gato doméstico como receptores e fêmeas domésticas como receptoras, que apresentam tamanho corporal e características reprodutivas semelhantes, com gestação entre 56-72 dias. Eles transferiram 435 embriões no estágio de 1-célula para o oviduto de 7 receptoras, e as sacrificaram entre 30 e 45 dias, obtendo 21 embriões implantados e 6 fetos formados com idade gestacional entre 30 e 45 dias, mas nenhum vivo. Outros 690 embriões foram transferidos para 14 fêmeas que foram mantidas durante 65 dias, entretanto, não houve nenhum nascimento (Yin *et al.*, 2006a).

Além destes trabalhos que conseguiram obter gestações ou nascimentos utilizando a NTSCi, outros autores vem reportando o desenvolvimento *in vitro* utilizando o citoplasma receptor de espécies diferentes da célula doadora do núcleo.

Um animal que vem sendo utilizado como doador de oócitos para a NTSCi é o coelho. A exemplo de Chen *et al.* (2002) que utilizaram oócitos de coelho para produzir embriões de panda, outros autores tem utilizado oócitos deste animal para a produção de embriões clones por NTSCi de outras espécies, como por exemplo em: macaco (Yang *et al.*, 2003), humanos (Chen *et al.*, 2003), gato doméstico (Wen *et al.*, 2003), elefante asiático – *Elephus maximus* (Numchaisrika *et al.*, 2005), cabrito montês – *Capra ibex* (Jiang *et al.*, 2005), gato marmorado (Thongphakdee *et al.*, 2006), suíno (Chen *et al.*,

2006), camelo (Zhao *et al.*, 2006) e antílope tibetano – *Panthalops hodgsonii* (Zhao *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007).

O gato doméstico também vem sendo utilizado com sucesso na produção de embriões de felinos selvagens, como do gato selvagem africano – *Felis lybica* (Gomez *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2005), do gato de patas negras – *Felis nigripes* (Gomez *et al.*, 2005), do gato marmoreado – *Pardofelis marmorata* (Thongphakdee *et al.*, 2006), gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*) (Lorthongpanich *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2006a; Yin *et al.*, 2006b).

De maneira semelhante, o citoplasma bovino vem sendo utilizado em muitos trabalhos e tem sido considerado por muitos pesquisadores como citoplasma receptor universal, pois com a utilização da NTSCi blastocistos de várias outras espécies foram produzidos, tais como ovino – *Ovis aries* (Dominko *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2007), suíno – *Sus scrofa* (Dominko *et al.*, 1999), búfalo – *Bubalus bubalis* (Kitiyant *et al.*, 2001; Atabay *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005), saola – *Pseudoryx ngetinhensis* (Bui *et al.*, 2002), antílope bongo – *Tragelaphus eurycerus isaaci* (Lee *et al.*, 2003), humano (Chang *et al.*, 2003; Illmensee *et al.*, 2006) búfalo africano – *Syncerus caffer* (Matshikiza *et al.*, 2004) antílope elande – *Taurotragus oryx* (Matshikiza *et al.*, 2004), cão doméstico – *Canis familiaris* (Murakami *et al.*, 2005) iaque – *Poephagus mutus* (Su *et al.*, 2005), iaque – *Bos grunniens* (Murakami *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2007), takin – *Budorcas taxicolor* (Li *et al.*, 2006a), goral – *Naemorhedus goral* (Oh *et al.*, 2006).

Por outro lado, autores afirmaram que o oócito bovino não é capaz de suportar o desenvolvimento de embriões interespecie, uma vez que embriões murinos não se desenvolveram além do estágio de 8-células (Arat *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004) ou mórula (Nieminem *et al.*, 2005) e embriões blastocistos caprinos não puderam ser produzidos por NTSCi em citoplasma bovino (Sansinena *et al.*, 2005)

2.11 Criopreservação de Oócitos

A transferência nuclear é uma técnica que possibilita a produção de embriões clones a partir de oócitos de abatedouro. Em locais onde existe o abate de grande número de animais, a capacidade de utilização destes oócitos é inferior à possibilidade de obtenção dos mesmos, visto que existe uma limitação temporal no seu uso, uma vez que estes embriões reconstruídos devem ser ativados em um determinado período de

tempo após o início da maturação. Desta maneira, a estratégia de criopreservação de oócitos possibilita o uso de um maior número de oócitos coletados em um mesmo dia. Além disto, variações sazonais alteram a qualidade do oócito como citoplasma receptor ao longo do ano, e a utilização de oócitos criopreservados como citoplasma receptor permite a coleta e armazenamento destes nos períodos mais favoráveis, com a sua utilização ao longo do ano.

Desde a descrição do nascimento de produtos obtidos através de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos maturados *in vitro* e vitrificados (Hamano *et al.*, 1992), a vitrificação de oócitos maturados vem sendo empregada por diversos autores (Massip, 2003). A partir de trabalhos utilizando o modelo da fecundação *in vitro*, alguns autores empregaram oócitos criopreservados como citoplasma receptor na NT. Trabalhos têm demonstrado que oócitos maturados e vitrificados têm a capacidade de suportar o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto em taxas semelhantes às aquelas observadas em citoplasmas oriundo de oócitos não vitrificados (Dinnyes *et al.*, 2000; Atabay *et al.*, 2004; Tominaga *et al.*, 2005) ou com taxas inferiores (Hou *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007a), dependendo do método de vitrificação empregado. Outra estratégia de criopreservação é a vitrificação de citoplastos de oócitos MII enucleados, que apesar de terem alcançado o desenvolvimento *in vivo*, proporcionaram taxas de desenvolvimento *in vitro* significativamente inferiores aquelas observadas com citoplastos frescos (Booth *et al.*, 1999).

Oócitos vitrificados imaturos têm sido utilizados para FIV com resultados variáveis. Apesar de existirem relatos onde não foi possível a produção *in vitro* de blastocistos utilizando estes oócitos (Matsumoto *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2005), alguns autores obtiveram taxas razoáveis de desenvolvimento *in vitro*, bem como o nascimentos de produtos viáveis a partir destes oócitos (Vieira *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2005). A utilização de oócitos vitrificados imaturos na clonagem é interessante do ponto de vista logístico, uma vez que podem ser coletados e vitrificados em locais onde existe o abate de um grande número de animais, ou onde a qualidade destes animais e oócitos é superior. Além disto, pode ser armazenada uma grande quantidade de oócitos, vitrificados sem a necessidade de estrutura laboratorial para a maturação sendo então transportados até o local da utilização. Apesar do relativo sucesso obtido com a criopreservação de oócitos imaturo para a FIV, não há relato descrito na literatura da utilização desta abordagem para a clonagem.

O congelamento convencional de oócitos para a clonagem foi descrito por (Kubota *et al.*, 1998). Estes autores congelaram oócitos imaturos, maturados ou enucleado para serem utilizados como citoplasma receptor na clonagem. Por esta estratégia, oócitos maturados e enucleados suportaram o desenvolvimento *in vitro* de maneira semelhante aos frescos, entretanto, os oócitos criopreservados imaturos obtiveram taxa de desenvolvimento inferior aquele observado em oócitos frescos. Por esta metodologia, os autores obtiveram produtos nascidos de embriões produzidos com citoplasma de oócitos MII vitrificados (Kubota *et al.*, 1998).

2.11.1 Injúrias Durante a Criopreservação

Sabe-se que as injúrias que determinam a diminuição nas taxas de desenvolvimento *in vitro* após a FIV de oócitos criopreservados incluem a redução do número e/ou alteração da posição dos grânulos corticais (Fuku *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 2000), alterações nos microtúbulos (Rho *et al.*, 2002), alterações nos microvilos (Fuku *et al.*, 1995), alterações no DNA (Men *et al.*, 2003), alterações nas mitocôndrias (Fuku *et al.*, 1995; Rho *et al.*, 2002), formação de vesículas (Fuku *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 2000) e alterações na zona pelúcida (Fuku *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 2000).

As alterações dos grânulos corticais e da zona pelúcida são menores em oócitos vitrificados imaturos avaliados depois da maturação (Fuku *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 2000; Diez *et al.*, 2005).

Trabalhos com microscopia eletrônica mostraram que oócitos fixados e avaliados, imediatamente após a vitrificação e reaquecimento, apresentam várias alterações morfológicas, sendo que algumas delas tendem a estar diminuídas ou mesmo desaparecer após algumas horas de cultivo *in vitro* (Hyttel *et al.*, 2000; Diez *et al.*, 2005).

Quando utilizamos oócitos maturados na vitrificação, o único parâmetro prático que temos no momento da utilização para NT é o aspecto morfológico. Por outro lado, a utilização de oócitos imaturos permite a posterior seleção daqueles que apresentam viabilidade suficiente para conseguir concluir a meiose, ou seja chegar a MII, ainda que com possíveis alterações cromossômicas. De qualquer maneira, como o DNA será removido, estas alterações têm menor importância na clonagem do que na FIV. De maneira semelhante, as alterações nos grânulos corticais que porventura ocorrem, são de menor importância na NT do que na FIV, uma vez que não necessitam realizar o

bloqueio da poliespermia. Outras alterações, como as que ocorrem nas mitocôndrias, têm o tempo correspondente a MIV para se recompor antes de serem submetidas a um novo procedimento de manipulação, procedimento este que induz a formação de *clusters* de REL, mitocôndrias além de gotas de lipídios (Greising e Jonas, 1999).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Água e Reagentes

A água utilizada para a preparação de todos os meios de cultivo foi estéril e apirogênica, obtida por ultrafiltração através de equipamento de purificação de água Milli-Q Synthesis (Millipore® Bedford, MA, EUA), com operação e manutenção seguidas conforme especificação do fabricante.

A maioria dos reagentes utilizados eram provenientes da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA) e o número de catálogo está indicado entre parênteses. Os demais reagentes estão especificados no decorrer do texto.

3.2 Obtenção e Seleção dos Oócitos

Os ovários foram colhidos imediatamente após o abate das vacas e transportados até o laboratório, em recipiente térmico contendo solução fisiológica suplementada com penicilina e estreptomicina (Apêndice A) a 35 °C. No laboratório, os ovários eram lavados em solução fisiológica e transferidos para outro recipiente até que fossem processados individualmente. Os complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) foram obtidos por fatiamento da córtex ovariana (*slicing*). Para isto, os ovários eram contidos com o auxílio de uma pinça hemostática e transferidos para placas de Petri de vidro de 150 mm contendo solução de PBS (Apêndice B), suficiente para que o ovário ficasse parcialmente coberto. O *slicing* foi realizado com instrumento composto de 5 lâminas paralelas, e a córtex ovariana foi finamente cortada, para que os CCOs fossem liberados para o PBS. Ao final do processamento de 20 ovários, o meio contendo os CCOs e fragmentos de ovários foi tamizado para um copo de Becker, adicionado PBS em quantidade suficiente para completar 200 mL e decantado durante 20 min. Após este período, o sobrenadante foi retirado por sifonagem e o sedimento transferido para tubos cônicos de 15 mL. O procedimento era repetido tantas vezes quantas fossem necessárias até o processamento de todos os ovários. O conteúdo sedimentado de cada um dos tubos de 15 mL era transferido para uma placa de Petri de 90 mm (C10, Pleion) onde foi realizada a procura, sob estereomicroscópio (15x). Conforme eram encontrados, os CCOs foram transferidos para placas de cultivo de 35 mm (627.160 - Greiner®, Freickenhausen, Alemanha) contendo TCM199-HEPES (Apêndice C). Ao final do processo de procura, os CCOs que apresentavam *cumulus oophorus* compacto e

citoplasma homogêneo sob estereomicroscopia, foram selecionados e lavados em meio TCM199-HEPES.

3.3 Obtenção e Cultivo das Células Doadoras de Núcleo

As células foram cultivadas em meio DMEM (Hölker *et al.*, 2005) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell[®]) descrito no Apêndice D, durante todas as etapas de cultivo. Foram manuseadas em fluxo laminar e incubadas em estufa de cultivo a 39 °C, com 5% de CO₂ em ar e atmosfera com a máxima saturação de umidade.

3.3.1 Cultivo Primário

Os fibroblastos bovinos e ovinos utilizados como doadores de núcleo, foram obtidos a partir de fragmentos de ovário recuperados após o *slicing* conforme procedimento descrito no item 3.2. Para isto, durante a procura dos oócitos, pequenos fragmentos de ovários eram coletados transferidos para placas de cultivo de 35 mm (627.160 - Greiner[®], Freickenhausen, Alemanha) contendo TCM199-HEPES, onde eram lavados 3 vezes. Ao final do processo, os fragmentos de ovários eram lavados no meio DMEM. Os fragmentos eram transferidos e cultivados em placas de 4 poços (Nunclon[®]144444 - Nunc[®], Roskilde, Dinamarca), contendo 150 µL do mesmo meio. Os fragmentos eram cultivados por aproximadamente uma semana antes da primeira passagem.

Os fibroblastos suínos foram obtidos através de biópsia auricular, por explantação. Para isto, foi realizada a limpeza com detergente e a tricotomia do pavilhão auricular, em seguida foi realizada antissepsia da região com álcool 70 °GL. Foi removido um fragmento triangular de tecido auricular, com aproximadamente 1 cm² com o auxílio de um assinalador para suínos em V. O tecido foi colocado em frasco estéril contendo PBS e transportado ao laboratório. No laboratório, o fragmento auricular foi novamente lavado em álcool 70 °GL e incubado durante 2 h em PBS contendo 500 µg/mL de gentamicina (Sigma, G1264) e nistatina. O fragmento foi lavado em PBS, separada a pele da cartilagem e ambos foram cortado em pequenos pedaços (1-2 mm²). Os fragmentos de tecido foram lavados no meio de cultivo e cultivados em placas de 4 poços (Nunclon[®]144444 - Nunc[®], Roskilde, Dinamarca) com 150 µL de DMEM, durante 12 dias antes de ser realizada a primeira passagem.

As células do *cumulus oophorus* bovinas e caprinas foram obtidas após a aspiração folicular guiada por ultrassonografia. O líquido folicular foi recuperado em tubos cônicos de 50 mL contendo PBS e transferido para placas de Petri de 90 mm, onde foi feita a procura dos CCOs sob estereomicroscopia. Os CCOs foram transferidos para placas de cultivo de 35 mm contendo TCM199-HEPES e as células do *cumulus* foram removidas dos oócitos por pipetagem. As células foram transferidas com auxílio de pipeta com controle bucal, para placas 4 poços contendo 400 µL de DMEM, onde foram cultivadas durante 5 dias antes da primeira passagem.

3.3.2 Cultivo Secundário

Quando um número considerável de células do cultivo primário se desprendia do fragmento, era realizada a primeira passagem. Para isto, o fragmento era removido e transferido para outra placa idêntica a fim de continuar liberando células, e as células já liberadas eram tripsinizadas e consideradas como de 1ª passagem. Para esta passagem inicial, as células eram lavadas com Tripsina Versene (VT, Apêndice E) e imediatamente adicionado o mesmo meio em quantidade suficiente apenas para cobrir o fundo da placa (200 µL). As células eram incubadas com a trispina até que o tapete celular se soltasse da placa, durante 5 a 10 minutos. Era adicionado meio 400 µL de DMEM e o conteúdo pipetado vigorosamente até que as células ficassem individualizadas e distribuídas homoganeamente. Nesta primeira passagem, as células eram mantidas no mesmo poço onde estavam inicialmente.

A partir da segunda passagem, tripsinização era realizada quando as células atingiam 80-90% de confluência, e eram transferidas para novas placas com área total equivalente a 3 vezes a área inicial. As células foram cultivadas em placa de 35 mm (627.160 - Greiner®, Freickenhausen, Alemanha) e 60 mm (628.160 - Greiner®, Freickenhausen, Alemanha). O processo de tripsinização e cultivo das células era semelhante ao realizado na primeira passagem, respeitando-se a quantidade de meio necessário para cada tipo de placa. As células foram cultivadas até a 3ª ou 4ª passagem, quando foram congeladas.

3.3.3 Congelamento das Células

Para o congelamento, as células foram submetidas à tripsinização e subsequente adição de meio DMEM. A suspensão com as células foi centrifugada a 200 x g, durante 3 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o centrifugado foi

ressuspensão em SBF, a temperatura ambiente. O frasco contendo a suspensão de células foi transferido para um banho de gelo, onde foi sendo resfriado durante o processo de adição de crioprotetor e envase. Ao frasco contendo as células, foi adicionado etilenoglicol (EG – Sigma, E9129) de maneira que a concentração final ficasse em 10%. A suspensão contendo o crioprotetor e as células foi envasada em palhetas de 0,5 mL e acondicionadas em recipiente refrigerado. As palhetas foram seladas termicamente e mantidas a 4 °C durante 1 h. Após este período, foram mantidas em vapor de N₂L durante 15 min e imersas em N₂L.

O volume de SFB e EG foi calculado de maneira que fosse mantida a proporção de 1,5 cm² de área confluenta células para cada dose de 0,5 mL, por exemplo seja as células contidas em uma placa de 60 mm (28,3 cm²) eram ressuspensas em 8,1 mL de soro, e adicionado 0,9 mL EG, com volume final de 9 mL, suficientes para envasar 18 palhetas.

3.3.4 Descongelamento e Utilização das Células

As palhetas foram armazenadas em botijões criogênicos, e descongeladas 3-5 dias antes da utilização na transferência nuclear. Para o descongelamento, as palhetas foram imersas em banho-maria a 37 °C, durante 30 s e o seu conteúdo depositado em um tubo cônico contendo 5 mL de meio DMEM, previamente aquecido. O tubo foi centrifugado a 200 x g, durante 3 min e o sobrenadante desprezado. O sedimentado contendo as células foi ressuspensão em 500 µL de meio DMEM e transferido para um poço de placa de 4 poços. Cada palheta continha células suficientes para conferir confluência de 70-80% em 3 dias de cultivo em um poço de 1,9 cm² (Nunclon[®]144444 - Nunc[®], Roskilde, Dinamarca).

No momento do uso, as células contidas em um poço foram tripsinizadas, conforme procedimento descrito anteriormente e ressuspensas em 1 mL de HSOF (Apêndice F).

3.3.5 Células-Tronco Obtidas de Tecido Adiposo

As células-tronco de tecido adiposo foram obtidas do tecido adiposo de uma fêmea da raça nelore e processadas no laboratório BIO-Biotecnologia Animal LTDA (Brasília, DF). As células foram transportadas de Brasília à Porto Alegre, em suspensão, dentro de tubos repletos de meio de cultivo, à temperatura ambiente durante 8 h. Ao chegarem ao laboratório, foram transferidas para placas e cultivadas a semelhança das

demais células descritas anteriormente. O meio utilizado para o cultivo destas células foi fornecido pela mesma empresa.

Os demais procedimentos de tripsinização, congelamento, descongelamento e utilização foram idênticos aos descritos para as outras células.

3.4 Vitrificação dos CCOs Imaturos e Reaquecimento

Os CCOs selecionados foram vitrificados em palhetas de 0,5 mL cortadas em bisel, de maneira que a solução contendo os oócitos não ocluisse completamente a luz da palheta evitando assim que fossem aspiradas por capilaridade no momento do reaquecimento (Figura 6). Foram utilizados 15 CCOs em cada palheta contendo 5 μ L de solução crioprotetora.

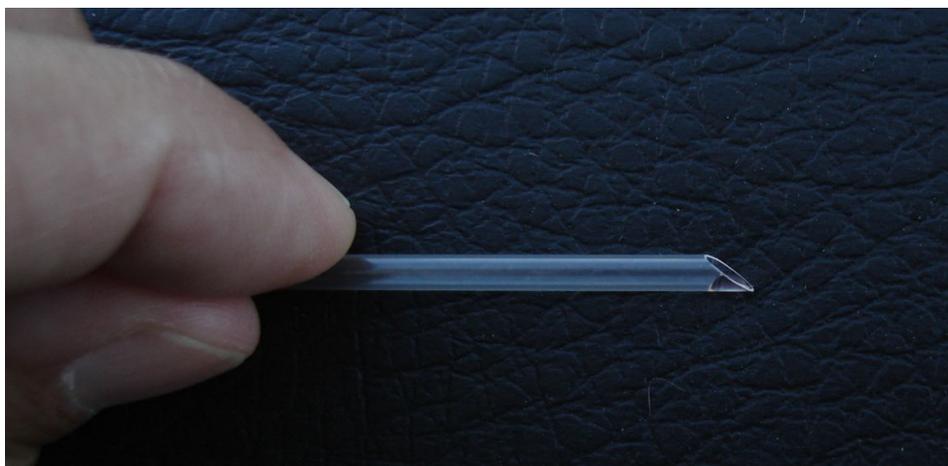


Figura 6. Sistema de vitrificação em gota na extremidade da palheta cortada em bisel.

Para a vitrificação e reaquecimento o meio base utilizado foi o TCM199-HEPES suplementado com 20% de soro de fetal bovino (SFB).

O protocolo de vitrificação foi adaptado de Vieira *et al.* (2008). Os oócitos foram mantidos em meio TCM-HEPES+SVE suplementado com 3 % de EG durante 5 min. Foram transferidos para a solução de equilíbrio contendo 10% EG + 10% dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma, D2650) durante 30 s, e em seguida transferidos para a solução de vitrificação (SV) contendo 20% EG + 20% DMSO + 0,48 M sacarose (SAC – Sigma, S1888). Gotas de 5 μ L desta solução, contendo 15 CCOs, foram depositadas na extremidade da palheta cortada em bisel e imersos em N₂L. O tempo total na SV antes da imersão em N₂L foi de 25 s. As palhetas eram armazenadas dentro de tubos cônicos de 15 mL, dentro de botijões criogênicos durante pelo menos 24 h.

Para o reaquecimento, a palheta era retirada do N₂L e a extremidade em bisel era imediatamente imersa em poço contendo 0,26 M SAC durante 5 min e 0,16 M SAC durante 5 min. Em seguida os CCOs eram transferidos para poço contendo 500 µL de meio de manutenção TCM-HEPES + 20% SVE, onde permaneciam até o momento de serem transferidos para a maturação.

3.5 Maturação dos Oócitos Frescos e Vitrificadas

Os oócitos frescos e vitrificados/reaquecidos eram maturados em grupos de 35-40 por poço contendo 500 µL de meio de maturação composto por TCM199 suplementado com FSH, hCG, estradiol e SVE (Oliveira *et al.*, 2005) como descrito no Apêndice G. Os oócitos frescos eram maturados durante 17 h, enquanto que os vitrificados eram maturados durante 22 h, a 39 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

3.6 Manipulação e Manutenção das Estruturas

Após o final da maturação, as células do *cumulus oophorus* foram removidas mecanicamente em meio HSOF modificado ou TCM-HEPES suplementado com 1 mg/mL de BSA (item 4.1.1). As estruturas eram transferidas para gotas do mesmo meio, sob óleo mineral (Sigma, M8410), sobre mesa aquecedora a 37°C, onde permaneciam até o final do processo.

Os oócitos foram selecionados de acordo com presença do corpúsculo polar e do aspecto do citoplasma. Oócitos frescos, não utilizados para NT, foram mantidos nestas gotas durante todo o tempo de manipulação e ativados partenogeneticamente juntamente com os NT, como controle da qualidade intrínseca dos oócitos, das condições de manipulação, ativação e cultivo.

3.7 Enucleação

Os oócitos que apresentavam o primeiro corpúsculo polar extrusado foram selecionados e submetidos à enucleação. Para isto os oócitos foram incubados durante 15 min em HSOF suplementado com 7,5 g/mL de citocalasina B (Sigma, C6762) e 5,0 µg/mL de Hoechst 33342 (Sigma, B2883).

As pipetas de micromanipulação foram produzidas no laboratório. As pipetas *holding* foram produzidas a partir de capilares de vidro de 1,5 mm de diâmetro externo (Perfecta[®], São Paulo, SP), esticadas manualmente em chama e as bordas arredondadas com calor na microforja MF-90 (Narishige[®], Toquio, Japão) de maneira que ficassem

com aproximadamente 120 μm de diâmetro externo e 40 μm de diâmetro interno. As pipetas de enucleação e transferência da célula foram confeccionadas a partir de capilares de vidro de borossilicato de 1,0 mm de diâmetro MTW100-4 (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EUA). Os capilares foram esticados no *puller* P-97 (Sutter Instruments Co., Novato, CA, EUA), cortados na microforja MF-90 (Narishige[®], Tokyo, Japão) e lixados na *microgrinder* EG-40 (Narishige[®], Tokyo, Japão) de maneira que ficassem com 15 a 20 μm de diâmetro interno e um bisel de 45°. A enucleação foi realizada sob microscópio óptico Axiovert 135 (Carl Zeiss[®], Jena, Alemanha), equipado com sistema de epi-fluorescência (luz UV e filtro G365) e micromanipulador Zeiss (Carl Zeiss[®], Jena, Alemanha), onde foram visualizados e removidos o corpúsculo polar e a placa metafásica (Figuras 7 e 8).

3.8 Reconstrução

As células doadoras de núcleo, previamente tripsinizadas, foram transferidas para o espaço perivitelino dos oócitos bovinos enucleados, através de micromanipulação, em HSOE com 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de citocalasina B (Figuras 9 e 10).

Os complexos reconstruídos (célula doadora-citoplasma receptor) foram transferidos para placa contendo 1 mL de meio de fusão (Apêndice H), sob óleo mineral. A fusão foi realizada com o auxílio de eletrodos acoplados a um sistema de micromanipulação sob estereomicroscopia (Figura 11). Os complexos reconstruídos foram posicionados de maneira que a célula doadora e o citoplasma receptor ficassem em linha com os eletrodos (Figura 12). A corrente elétrica aplicada foi de 20 V durante 45 μs , utilizando o equipamento de eletrofusão ECM 2001 (BTX, Holliston, MA, EUA).

Após a fusão, os complexos reconstruídos foram transferidos para o HSOE e a avaliação da taxa de fusão foi realizada 30 min após a eletrofusão, através da observação sob estereomicroscopia. Os complexos reconstruídos não fusionados foram submetidos a uma segunda descarga elétrica de mesma intensidade e duração. Trinta minutos após a segunda fusão foi determinada a taxa de fusão.

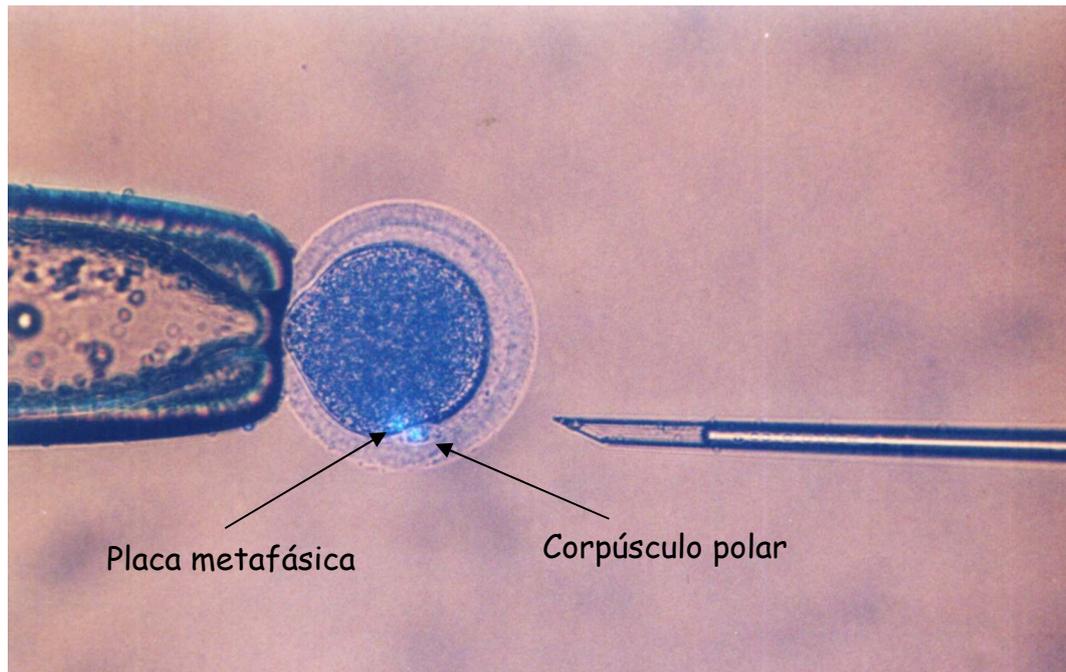


Figura 7. Visualização da placa metafásica e do corpúsculo polar.

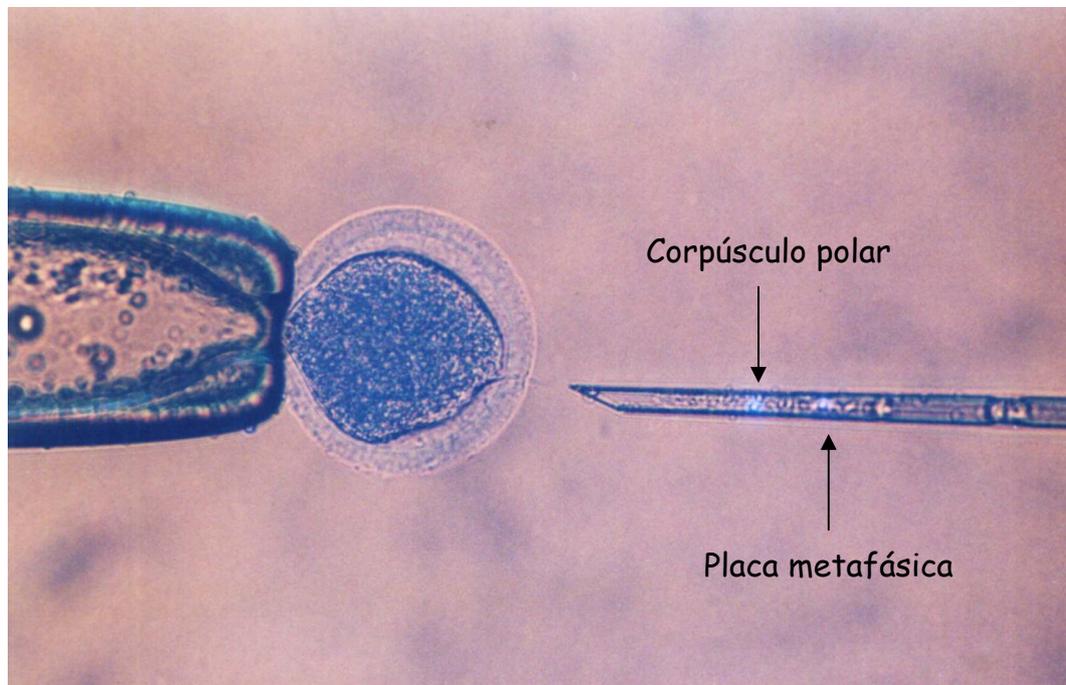


Figura 8. Corpúsculo polar e placa metafásica dentro da pipeta de micromanipulação após serem removidos do oócito.

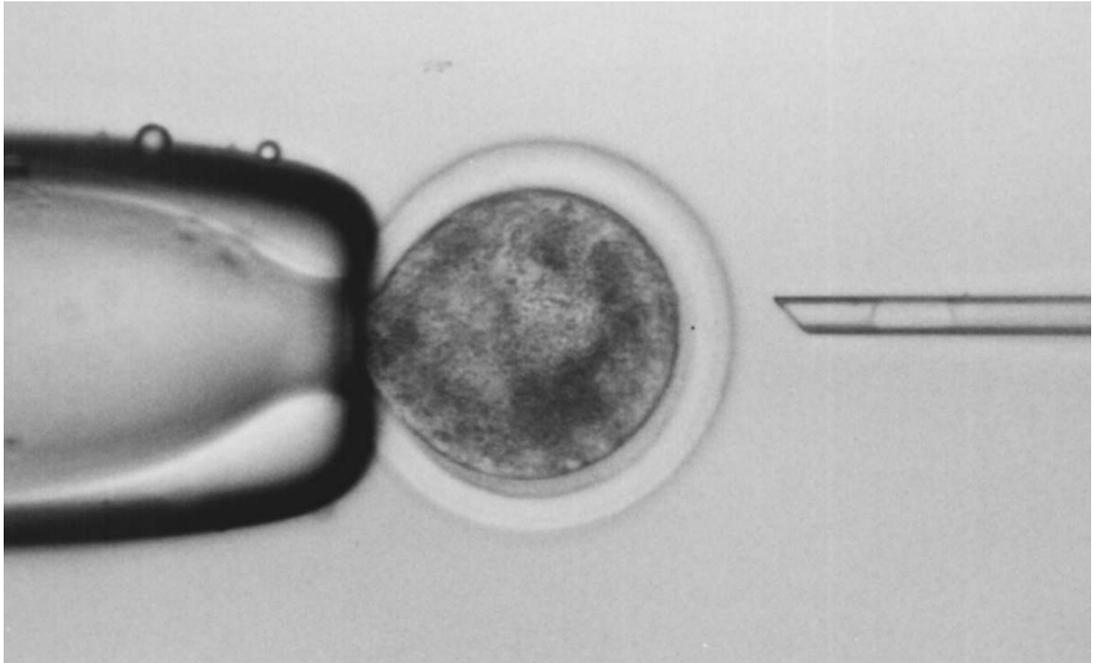


Figura 9. Célula doadora de núcleo na pipeta de micromanipulação.

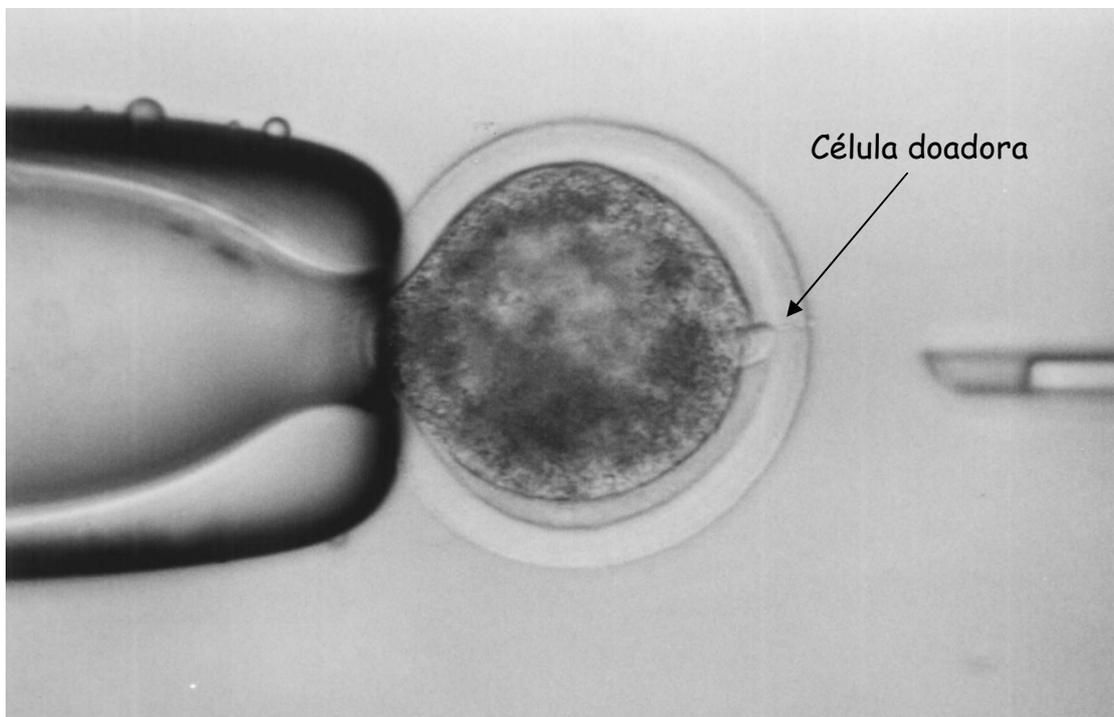


Figura 10. Célula doadora de núcleo introduzida no espaço perivitelino.



Figura 11. Sistema para a manipulação dos eletrodos de eletrofusão.

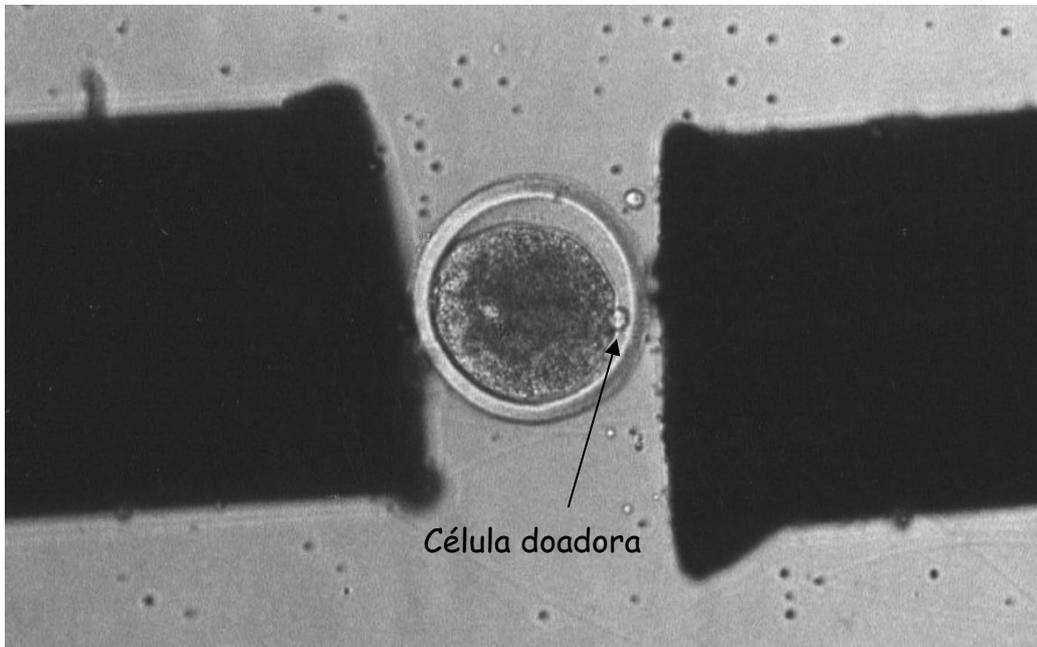


Figura 12. Oócito enucleado com a célula doadora no espaço perivitelino, alinhados ao eletrodo de eletrofusão.

3.9 Ativação dos Complexos Reconstruídos

Os complexos reconstruídos foram ativados quimicamente 45 a 90 min após receberem o estímulo para a fusão. Foram utilizados dois protocolos de ativação denominados DMAP e CHX. Em ambos os protocolos, a ativação inicial foi realizada através da incubação em 5 μ M de ionomicina (Sigma, I0634) em HSOF. No protocolo DMAP, subseqüentemente, os complexos reconstruídos foram incubados durante 3 h e 30 min em meio SOF suplementado com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP - Sigma, D2629). Ao passo que no protocolo CHX, os complexos reconstruídos foram incubados durante 5 h em meio SOF suplementado com 10 μ g/mL ciclohexamida e 2,5 μ g/ml citocalasina D (Sigma, C8273). Todo o procedimento de ativação foi realizado a 37°C, sendo que a ativação inicial com ionomicina foi realizada em atmosfera ambiente e a ativação subsequente tanto no protocolo DMAP como no CHX, foi realizada com 5 % de CO₂ em ar.

3.10 Ativação Partenogenética

Oócitos bovinos foram mantidos nas mesmas condições que os utilizados para a transferência nuclear (3.6), foram ativados partenogeneticamente, no mesmo momento que os embriões reconstruídos, com os mesmos protocolos descritos no item anterior (3.9). Foram utilizados como controle das condições da execução da técnica e da qualidade intrínseca dos oócitos. Além disto, também foram utilizados como modelo experimental para a execução de alguns experimentos de otimização das condições de manutenção e cultivo *in vitro*.

3.11 Cultivo *in vitro*

Embriões ativados partenogeneticamente foram cultivados em meio NCSU23 (Petters e Wells, 1993) modificado (Apêndice I), SOF (Tervit *et al.*, 1972) modificado (Apêndice J) e KSOM (Erbach *et al.*, 1994) modificado (Apêndice K).

Os embriões reconstruídos (NT) bovino-bovino, caprino-bovino e ovino-bovino foram cultivados em meio SOF modificado, suplementado com 4 mg/mL de BSA ou 10% de SVE.

Os embriões reconstruídos (NT) suíno-bovino foram cultivados no meio NCSU23 modificado suplementado com 10% de SVE.

Todos os embriões foram cultivados em grupos de até 20 estruturas, em gotas 80 μ L, sob óleo mineral (Sigma, M8410), em estufa a 39°C, com 100% de umidade relativa, dentro de câmaras de cultivo adaptadas (Ref. 719/5, Sanremo[®], Canoas, RS) com 5% de CO₂, 5% de O₂ em N₂, durante 7 dias.

3.12 Avaliação do Desenvolvimento *in vitro*

A taxa de clivagem foi observada no mínimo 48 h após o início do CIV e a taxa de blastocisto foi observada no 7^o dia, considerando o momento da ativação como Dia 0.

3.13 Vitrificação dos Embriões

Os embriões foram vitrificados de acordo com protocolo descrito por Vieira *et al.* (2007). O meio de básico utilizado no processo de vitrificação e reaquecimento foi o PBS suplementado com 10% de SFB.

Os embriões foram transferidos para a solução de equilíbrio contendo 10% EG + 10% DMSO durante 60 s, e em seguida transferidos para a solução de vitrificação (SV) contendo 20% EG + 20% DMSO. Os embriões foram envasados em gotas de 1-2 μ L do mesmo meio, individualmente dentro de pipetas de vidro de 0,6 mm de diâmetro (Vieira *et al.*, 2008) e imersos imediatamente em N₂L. O tempo total na SV antes da imersão em N₂L foi de 25 s. As pipetas de vidro eram armazenadas dentro de palhetas de 0,5 mL em botijões criogênicos.

Para o reaquecimento, a pipeta de vidro foi retirada do N₂L e introduzida em um tubo contendo 1,2 mL de solução de aquecimento (0,26 M SAC) a 39 °C, que entra na pipeta por capilaridade. Com auxílio de uma seringa, o conteúdo da pipeta foi transferido para o interior de uma palheta de 0,25 mL. O embrião foi mantido neste sistema durante 5 min antes da transferência para receptoras síncronas, por via cervical.

3.14 Análise Estatística

Os resultados obtidos no desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Otimização da Técnica de Transferência Nuclear

Na primeira etapa, uma série de experimentos foi realizada visando otimizar a técnica de clonagem nas condições do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução. O objetivo desta etapa foi obter blastocistos produzidos por NTSC e NTSCi.

4.1.1 Efeito do meio de manutenção em atmosfera ambiente

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de dois meios de manutenção em atmosfera ambiente sobre o desenvolvimento de embriões partenogênicos. Para isto oócitos maturados foram mantidos em TCM-HEPES ou HSOF durante 7 h, sob óleo mineral sobre mesa térmica (37 °C) antes da ativação partenogenética. Os embriões foram cultivados em meio SOF+SVE. Neste experimento foram realizadas duas repetições.

4.1.2 Otimização do sistema de ativação química

A otimização da ativação química foi realizada utilizando embriões NTSC bovinos e NTSCi ovinos. Para isto, complexos reconstruídos com células do *cumulus* bovinas de um único animal foram ativados quimicamente com ionomicina durante 5 min e subseqüentemente com ciclohexamida e citocalasina D (CHX+CD) durante 5 h ou 6DMAP durante 3 h e 30 min. Os embriões reconstruídos foram cultivados com SOF+SVE. Neste experimento foram realizadas três repetições de cada tratamento.

Em outro experimento, complexos reconstruídos com fibroblastos ovino e citoplasma receptor bovino foram ativados com dois protocolos diferentes (6DMAP e CHX+CD) e cultivados com SOF suplementado com SVE. Neste experimento foram realizadas três repetições de cada tratamento.

4.1.3 Efeito do meio de cultivo sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões

Oócitos ativados partenogeneticamente com o protocolo do 6DMAP foram cultivados em meio SOF ou NCSU23 (seis repetições para cada tratamento) e SOF ou KSOM (duas repetições para cada tratamento) suplementados com 10% de SVE.

4.1.4 Efeito da fonte protéica no meio de cultivo embrionário

Embriões NTSC bovino e NTSCi ovino-bovino foram obtidos de fibroblastos de um único animal doador de cada espécie, ativados com 6DMAP e cultivados em meio SOF suplementado com 10% de SVE ou 4 mg/mL de BSA. O efeito da fonte protéica foi determinado através das taxas de clivagem e blastocistos ao longo de 10 repetições para os embriões NTSC bovino e duas repetições para os embriões NTSCi ovino-bovino.

4.1.5 Efeito do genótipo da célula doadora de núcleo para embriões NT

Embriões foram reconstruídos utilizando fibroblastos bovinos oriundos de dois animais diferentes (Angus e Holandês) ativados com 6DMAP e cultivados em meio SOF suplementado com 10% de SVE, em 11 repetições para um animal e duas para o outro (respectivamente).

4.1.6 Efeito do tipo celular utilizado da célula doadora de núcleo para embriões NTSC

Células de duas origens (fibroblasto e *cumulus oophorus*) de um único animal doador foram utilizadas como doadoras de núcleo para a reconstrução de embriões clones, que foram ativados pelo protocolo do 6DMAP e cultivados em meio SOF suplementado com 10% de SVE. As taxas de desenvolvimento embrionário foram observadas ao longo de 3 repetições.

4.1.7 Vitriificação dos embriões clones e avaliação *in vivo*

Alguns embriões, produzidos ao longo dos experimentos anteriores, foram vitrificados e transferidos para receptoras, ou transferidos a fresco, com objetivo de avaliar a capacidade de desenvolvimento *in vivo*, de acordo com a disponibilidade de receptoras.

4.2 Produção de Embriões Interespécie (NTSCi)

Nestes experimentos, foram comparadas apenas repetições realizadas nas mesmas condições, ou seja, durante o mesmo período de tempo, utilizando o mesmo tipo celular e mesma fonte protéica no cultivo dos embriões. Apenas o protocolo de ativação utilizando o 6DMAP foi utilizado. Foram comparadas as taxas de fusão, clivagem e blastocistos entre embriões produzidos por NTSCi e NTSC bovinos.

4.2.1 Produção de embriões clones NTSCi ovino-bovino

Neste experimento, embriões NTSCi ovino-bovino e NTSC bovino-bovino foram produzidos a partir de fibroblastos e cultivados em meio SOF suplementado com SVE. Foram realizadas 5 repetições.

4.2.2 Produção de embriões clones NTSCi caprino-bovino

Embriões caprinos-bovinos e bovinos-bovinos foram reconstruídos utilizando células do *cumulus* como doador de núcleo e cultivados em meio SOF com BSA em duas repetições.

4.2.3 Produção de embriões clones NTSCi suíno-bovino

Embriões reconstruídos foram reconstruídos com fibroblastos bovinos e suínos e cultivados na presença de SVE. Embriões NTSCi suínos foram cultivados em meio NCSU23, enquanto, embriões NTSC bovinos foram cultivados em meio SOF com SFB, em duas repetições.

4.3 Utilização de Oócitos Vitrificadas como Citoplasma Receptor

Oócitos vitrificadas e não vitrificadas foram utilizadas como citoplasma receptor para a produção de clones bovinos, ativados com o protocolo do 6DMAP e cultivados em meio SOF com SVE. Todos os oócitos recuperados após a vitrificação foram submetidos à maturação. Os parâmetros utilizados para a comparação entre os oócitos vitrificadas e não vitrificadas foram as taxas de recuperação após o desnudamento, taxa de maturação através do percentual de oócitos que apresentavam um corpúsculo polar, taxa de sobrevivência após a micromanipulação (enucleação e transferência da célula doadora), taxa de fusão, taxa de sobrevivência após a ativação, taxa de clivagem e de blastocistos, durante seis repetições.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização da Técnica de Transferência Nuclear

Durante este trabalho, 1.123 estruturas foram reconstruídas em diferentes condições, sendo que 95 blastocistos foram produzidos, em 56 rotinas de clonagem. O primeiro blastocisto foi produzido na 5ª rotina. Após a transferência de parte destes embriões (24 TE), 13 prenhez foram estabelecidas. Entretanto, a maioria delas foi perdida com o decorrer do tempo. Uma prenhez gemelar alcançou os 260 dias e outra chegou a termo com o nascimento de um clone vivo.

5.1.1 Efeito do meio de manutenção em atmosfera ambiente

As taxas de desenvolvimento *in vitro* após ativação partenogenética, de oócitos mantidos em TCM-HEPES ou HSOF durante 7 h sobre mesa térmica em atmosfera ambiente estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Taxas de desenvolvimento *in vitro* de oócitos ativados partenogeneticamente após manutenção em meio TCM-HEPES ou HSOF.

Meio de manipulação	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n	n	%	n	%	
TCM-HEPES	76	41	53,9 ^a	16	21,0 ^a	
HSOF	83	58	69,9 ^b	26	31,3 ^a	

^{a,b} letras desiguais na mesma coluna referem diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

5.1.2 Otimização do sistema de ativação química

Embriões NTSC foram quimicamente ativados com CHX+CD ou 6DMAP e cultivados *in vitro* e as taxas de desenvolvimento embrionário estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento de embriões NTSC bovinos ativados quimicamente com ionomicina e subseqüentemente com CHX+CD ou 6DMAP.

Ativação	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n	n	%	n	%	
CHX+CD	23	14	60,8	6	26,1	
6DMAP	85	55	64,7	10	11,8	

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p > 0,05$)

Complexos reconstruídos ovino-bovino foram ativados com dois protocolos diferentes (6DMAP e CHX+CD) e cultivados com SOF suplementados com SVE. Os resultados de desenvolvimento *in vitro* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Taxas de desenvolvimento de embriões clones interespecie, de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula ovina utilizando diferentes protocolos de ativação.

Ativação	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
CHX+CD	28		19	67,9	2	7,1
6DMAP	58		35	60,3	6	10,3

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

5.1.3 Efeito do meio de cultivo sobre o desenvolvimento *in vitro*

Oócitos ativados partenogeneticamente foram cultivados em meio SOF ou NCSU23 ou KSOM suplementados com 10% de SVE, e os resultados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões partenogênicos cultivados em meio SOF ou NCSU.

Meio de cultivo	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
SOF	169		130	76,9	66	39,1
NCSU23	165		126	76,4	58	35,1

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

Tabela 5. Taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões partenogênicos cultivados em meio SOF ou KSOM.

Meio de cultivo	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
SOF	48		42	87,5	12	25,0
KSOM	47		42	89,4	14	29,7

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

5.1.4 Efeito da fonte protéica no meio de cultivo SOF

As taxas de desenvolvimento embrionário de embriões NTSC bovino cultivados em meio SOF suplementado com 10% de SVE ou 4 mg/mL de BSA estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSC cultivados em meio SOF suplementado com SVE ou BSA.

Fonte Protéica	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
BSA	121		72	59,6 ^a	3	2,5 ^a
SVE	213		128	60,1 ^a	31	14,5 ^b

^{a,b} letras desiguais na mesma coluna referem diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

Os resultados de desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSCi ovino-bovino cultivados em SOF suplementado com SVE ou BSA estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Taxas de desenvolvimento de embriões clones interespecie, de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula ovina utilizando diferentes fontes protéicas no meio de cultivo.

Fonte protéica	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
BSA	33		23	70,0 ^a	0	0,0 ^a
SVE	58		35	60,3 ^a	6	10,3 ^b

^{a,b} letras desiguais na mesma coluna referem diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

5.1.5 Efeito do genótipo da célula doadora de núcleo para embriões NT

Embriões foram reconstruídos utilizando fibroblastos bovinos oriundos de dois animais (cada um de uma raça) e as taxas de desenvolvimento embrionário estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões clones obtidos a partir de animais diferentes.

Doador	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
Angus	213		128	60,1	31	14,5
Holandês	41		26	63,4	8	19,5

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p > 0,05$)

5.1.6 Efeito do tipo celular da célula doadora na NTSC

As taxas de clivagem e blastocistos obtidas durante o cultivo *in vitro* de embriões NTSC bovinos obtidos a partir de fibroblastos ou células do *cumulus* provenientes de um único animal estão sumarizadas na Tabela 9.

Tabela 9. Taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões clones obtidos a partir de dois tipos celulares de um animal.

Tipo celular	Cultivados	Clivados		Blastocistos	
	n	n	%	n	%
Fibroblasto	41	26	63,4	8	19,5
Célula do <i>cumulus</i>	85	55	64,7	10	11,8

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

5.1.7 Efeito do genótipo e da origem da célula doadora de núcleo sobre o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*

Foram utilizadas células do *cumulus*, fibroblastos e células tronco de tecido adiposo como doadoras de núcleo, de três animais diferentes. Os embriões foram ativados pelo protocolo do 6DMAP e cultivados em meio SOF com SVE e os resultados do desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10. Taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões clones obtidos a partir de três tipos celulares e animais diferentes.

Doador	Tipo celular	Cultivados	Clivados		Blastocistos	
		n	n	%	n	%
Holandês	Célula do <i>cumulus</i>	85	55	64,7	10	11,7
Angus	fibroblasto	213	128	60,1	31	14,5
Nelore	Célula tronco de tecido adiposo	123	77	62,6	14	11,4

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

Tabela 11. Taxa de desenvolvimento *in vivo* de embriões clones obtidos a partir de três tipos celulares e animais diferentes.

Doador	Tipo celular	TE	35 dias		260 dias	
		n	n	%	n	%
Holandês	Célula do <i>cumulus</i>	7	2	28,6	1	14,3
Angus	fibroblasto	12	8	66,7	0	0,0
Nelore	Célula tronco de tecido adiposo	5	3	60,0	1	20,0

5.1.8 Efeito da vitrificação dos embriões NTSC sobre o desenvolvimento *in vivo*

As taxas de desenvolvimento *in vivo*, de embriões clones submetidos ou não à vitrificação estão sumarizadas na tabela abaixo.

Tabela 12. Taxa de desenvolvimento *in vivo* de embriões clones submetidos ou não à vitrificação.

Tipo de embrião	TE	35 dias		260 dias	
	n	n	%	n	%
Fresco	13	6	46,1	1	7,7
Vitrificado	11	7	63,6	1	9,1

5.1.9 Avaliação do desenvolvimento perinatal

Uma gestação gemelar alcançou 260 dias de prenhez após a transferência de um único blastocisto em eclosão (Figura 13). Os fetos abortados foram encontrados no campo (Figuras 14). A análise do DNA microsatélite (Anexos A, B, C, D e E) dos fetos, da doadora da célula (Figura 15) e da receptora confirmou a identidade dos animais. Os fetos foram necropsiados e todos os órgãos examinados (incluindo os vasos umbilicais) apresentavam-se normais ao exame macroscópico e histopatológico, com exceção dos pulmões que apresentavam mecônio em seu interior (Anexo F e G). Nenhuma causa infecciosa foi identificada e o aborto possivelmente ocorreu por insuficiência placentária, uma vez que os fetos eram morfológicamente normais, tinham peso (20 kg cada) e medidas compatíveis com esta idade gestacional. A análise do DNA mitocondrial foi realizada através do sequenciamento da região do gene ND5 e não foi observada diferença entre os clones (Anexo H).

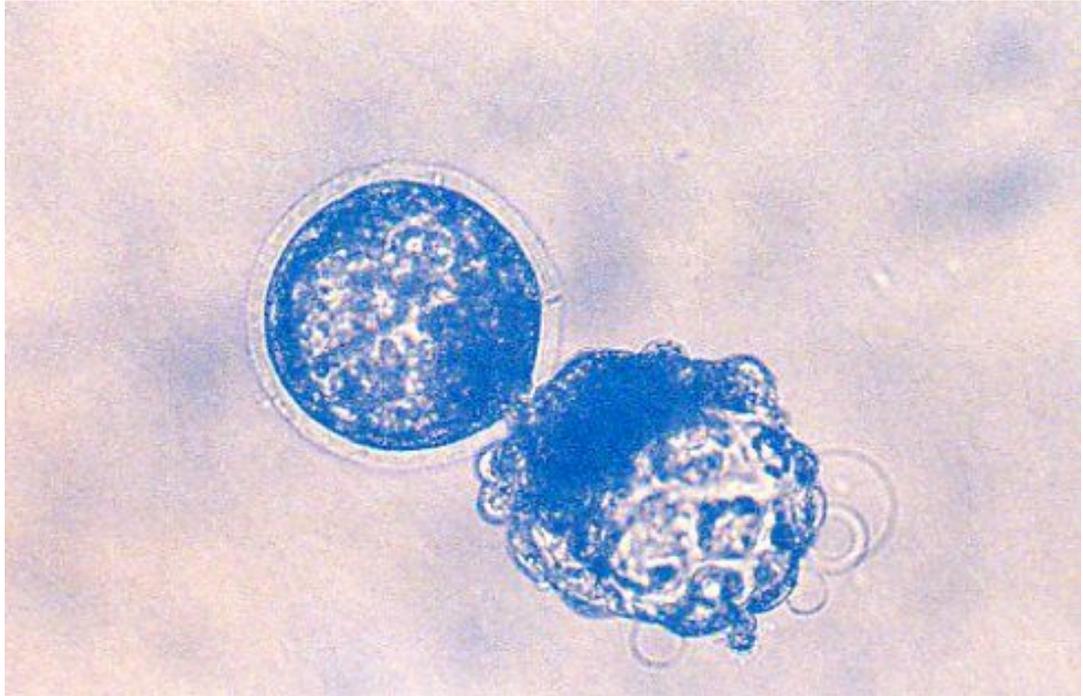


Figura 13. Blastocisto em eclosão, submetido à vitrificação e transferência direta para receptora.



Figura 14. Fetos abortados encontrados no campo do dia 260 de gestação.



Figura 15. Vaca doadora das células doadoras de núcleo.

Outra gestação chegou a termo com o nascimento de um clone da raça nelore (Figura 16). O animal nasceu com 25 kg e apresentou problemas respiratórios que o levaram a morte com 42 h de vida. Esse animal apresentava úraco persistente e degeneração gordurosa hepática. A evolução clínica e os procedimentos realizados estão relatados no Apêndice L. As alterações macroscópicas observadas na necropsia estão descritas no Apêndice M. O resultado do exame histopatológico está descrito no Anexo I e as fotos da histopatologia nos Anexo J.



Figura 16. Neonato clone de animal Nelore com 15 h de vida.

5.2 Produção de Clones Interespécie (NTSCi)

5.2.1 Produção de embriões NTSCi ovino-bovino

Embriões NTSCi ovino-bovino foram reconstruídos com fibroblastos ovinos e embriões NTSC bovino-bovino com fibroblastos bovinos e fusionados nas mesmas condições. A taxa de fusão dos embriões interespécie reconstruídos está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Taxas de fusão de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora ovina ou bovina.

Célula	Reconstruídos		Fusionados	
	n		n	%
Ovina	91		81	89,0
Bovina	92		83	90,2

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

As taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSCi ovino-bovino não apresentaram diferença significativa quando comparados aos homoespecíficos bovino-bovino (Tabela 14), utilizando o mesmo tipo celular, mesmo sistema de ativação e mesmo sistema de cultivo.

Tabela 14. Taxas de desenvolvimento de embriões clones interespécie (ovino-bovino) e homoespecíficos (bovino-bovino), cultivados em meio SOF suplementado com SVE.

Célula doadora	Cultivados		Clivados		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
Ovina	58		35	60,3	6	10,3
Bovina	63		36	57,1	8	12,7

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

5.2.2 Produção de embriões NTSCi caprino-bovino

Na Tabela 15 encontra-se sumarizada a taxa de fusão dos embriões reconstruídos com células caprinas ou bovinas em citoplasma bovino.

Tabela 15. Taxas de fusão de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora caprina ou bovina.

Célula	Reconstruídos		Fusionados	
	n		n	%
Caprina	53		41	77,4
Bovina	34		29	85,3

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

As taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSCi caprinos-bovinos e NTSC bovinos estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora caprina ou bovina.

Célula doadora	Cultivados		Clivagem		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
Caprina	19		13	68,4	1	5,3
Bovina	29		23	79,3	3	10,3

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

5.2.3 Produção de embriões NTSCi suíno-bovino

Fibroblastos suínos e bovinos foram utilizados para a reconstrução dos embriões suíno-bovino e bovino-bovino, respectivamente. As taxas de fusão estão sumarizadas na Tabela 17.

Tabela 17. Taxas de fusão de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora suína ou bovina.

Célula	Reconstruídos		Fusionados	
	n		n	%
Suína	34		27	79,4
Bovina	37		31	83,8

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p>0,05$)

A Tabela 18 apresenta taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSCi suínos, cultivados em meio NCSU23 e embriões NTSC bovinos.

Tabela 18. Taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* de complexos reconstruídos com citoplasma bovino e célula doadora suína ou bovina.

Célula doadora	Cultivados	Clivagem		Blastocistos	
	n	n	%	n	%
Suína	21	12	57,1	0	0,0
Bovina	28	11	39,3	3	10,7

Não houve diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p > 0,05$)

Embriões NTSCi suínos foram cultivados em dois meios diferentes SOF e NCSU23. As taxas de clivagem foram semelhantes 60% (6/10) e 70% (7/10), não havendo desenvolvimento até blastocisto em nenhum dos sistemas.

5.3 Produção de Clones Bovinos Utilizando como Citoplasma Receptor Oócitos Vitricados

Oócitos vitricados e não vitricados foram maturados *in vitro* e utilizados como citoplasma receptor para a produção de clones bovinos e as taxas de recuperação e de maturação avaliada pela presença do corpúsculo polar (PB) estão apresentadas na Tabela 19. Foi observado durante o desnudamento que muitos dos oócitos não recuperados estavam com a zona pelúcida rompida.

Tabela 19. Taxa de recuperação após o desnudamento e de maturação, avaliada pela presença de PB, dos CCOs vitricados e controle (frescos).

Oócitos	Maturados	Recuperados		PB	
	n	n	%	n	%
Fresco	579	529	91,4 ^a	348	65,8 ^a
Vitricado	764	558	73,0 ^b	261	46,8 ^b

^{a,b} letras desiguais na mesma coluna referem diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

As taxas de sobrevivência após as etapas de micromanipulação, as taxas de fusão e sobrevivência após a ativação não apresentaram diferença significativa entre os grupos vitricado e não vitricado e estão sumarizadas na Tabela 20.

Tabela 20 Eficiência e eficiência cumulativa durante as etapas da clonagem utilizando oócitos vitrificados e não vitrificados como citoplasma receptor.

Etapas	Eficiência* (%)		Eficiência cumulativa** (%)	
	Vitrificados	Frescos	Vitrificados	Frescos
Recuperação após a vitrificação e reaquecimento	96,3	-	96,3	-
Recuperação após maturação e desnudamento	73,0	91,4	71,4	91,4
Taxa de maturação - Oócitos com corpúsculo polar	46,8	65,8	33,4	60,1
Micromanipulação (enucleação e transferência da célula doadora)	77,8	78,4	26,0	47,1
Taxa de fusão	82,1	82,3	21,5	38,8
Sobrevivência após a ativação	79,9	83,7	17,2	32,5

* Percentual sobre a etapa anterior

** Percentual sobre o número inicial de oócitos

Os complexos reconstruídos com citoplasma oriundo de oócitos vitrificados e não vitrificados cultivados *in vitro* e as taxas de desenvolvimento embrionário estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21. Taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões produzidos por transferência nuclear utilizando como citoplasma receptor oócitos vitrificados ou não vitrificados.

Oócitos	Cultivados	Clivados		Blastocistos		
	n	n	%	n	%*	%**
Fresco	128	77	60,2 ^a	18	14,1 ^a	23,4 ^a
Vitrificado	127	60	47,2 ^b	10	7,9 ^a	16,7 ^a

* percentual sobre os cultivados

** percentual sobre os clivados

^{a,b} letras desiguais na mesma coluna referem diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

No controle das condições de manutenção, ativação e cultivo, durante a transferência nuclear, os oócitos controle (não vitrificados) não utilizados na micromanipulação, foram ativados juntamente com os NT. Dos 106 oócitos ativados partenogeneticamente, 71,7% clivaram e 31 (29,2%) chegaram até o estágio de blastocistos. Os oócitos vitrificados foram utilizados apenas para NT.

6 DISCUSSÃO

6.1 Otimização da Técnica de Transferência Nuclear

A primeira fase do trabalho teve por objetivo estabelecer as condições da técnica de clonagem por transferência nuclear que possibilitassem a produção de blastocistos e de prenhezes.

Os resultados de produção *in vitro* por clonagem até o estágio de blastocisto, geralmente se assemelham aos dados de embriões fecundados *in vitro*; entretanto, a eficiência final da técnica ainda permanece muito baixa, entre 0,5 e 5,0% (Heyman *et al.*, 2002).

Apesar dos avanços que vem sendo alcançados nas técnicas de transferência nuclear para a produção de animais clones, não existe um consenso entre protocolos de NTSC. Mesmo quando experimentos são realizados nas mesmas condições, o protocolo que é melhor para um tipo celular não funciona tão bem para outro. Powell *et. al* (2004) demonstraram, em experimento realizado com mais de 4.000 complexos reconstruídos, que condições excelentes para determinada célula foram ineficientes para outra. Os autores ressaltam que condições que resultam em taxas de desenvolvimento *in vitro*, podem determinar em baixa ou nenhuma produção *in vivo*. Desta maneira, se faz necessária a implementação da técnica de transferência nuclear nas condições do nosso laboratório, comparando diversos protocolos para que se eleja o mais adequado dentro da nossa realidade.

Inicialmente, as condições de fusão foram estabelecidas, testando-se diversos parâmetros, obtendo-se resultados entre 90 e 95 % de fusão (dados não apresentados).

A redução da concentração do soro no cultivo celular de 10% para 0,5% alguns dias antes da utilização das células para NT é uma estratégia para induzir as células a entrar em G0, o que vem sendo empregada por muitos laboratórios, uma vez que esta estratégia permitiu o primeiro nascimento de clone viável (Wilmot *et al.*, 1997). Entretanto, nas nossas condições, este protocolo induziu uma alta mortalidade das células que seriam utilizadas para a NTSC, e desta forma, foi utilizada a inibição por contato para indução de G0 em nossos experimentos, sendo utilizadas células com alta confluência.

Assim como é empregado em diversos protocolos (Wells *et al.*, 1999; Heyman *et al.*, 2002; Atabay *et al.*, 2004), inicialmente, foi utilizada hialuronidase para a remoção das células do *cumulus* antes da clonagem. Entretanto, nós observamos que as células foram facilmente removidas por pipetagem, quando o período de maturação não excedia 17 h e o meio utilizado era o HSOF, o que dispensou o uso de hialuronidase, diferentemente do que o ocorria quando era utilizado o TCM-HEPES como meio de manipulação. Este dado, juntamente com as taxas de desenvolvimento *in vitro* observadas (Tabela 1), conduziu-nos a utilizá-lo como meio de eleição para a manipulação em atmosfera ambiente.

Tanto o 6DMAP ou como a ciclohexamida (CHX) são empregados amplamente nos protocolos de ativação descritos na literatura (Campbell *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Nas nossas condições, não houve diferença significativa entre os dois protocolos de ativação sobre as taxas de desenvolvimento *in vitro* (Tabelas 2 e 3). Entretanto, pelo 6DMAP ser um inibidor de proteíno-quinase, esse promove uma inibição mais específica do que a ciclohexamida, que é um inibidor da síntese protéica (Alberio *et al.*, 2001). Assim, o 6DMAP foi empregado como protocolo padrão de ativação. Além disto, outra facilidade prática é a necessidade de menor tempo de incubação (3 h e 30 min) do que a CHX, que necessita de 5 h (dados não publicados).

Em relação ao meio de cultivo utilizado, embriões bovinos partenogênicos desenvolveram-se de maneira semelhantes em meio KSOM, NCSU23 e SOF (Tabelas 4 e 5). No que diz respeito à suplementação protéica, em experimentos anteriores realizados com embriões FIV, conseguimos produzir embriões com taxas de desenvolvimento *in vitro* até blastocisto semelhantes quando utilizamos SOF suplementado com BSA ou SVE (Forell *et al.*, 2004). Entretanto, para os embriões clones, o uso da BSA proporcionou taxas de desenvolvimento *in vitro* até blastocisto significativamente menores do que o SVE (Tabelas 6 e 7), o que tornou inviável a sua utilização. Podemos observar que quando os oócitos foram de boa qualidade esses parecem suportar o desenvolvimento com BSA; entretanto, quando a qualidade não é boa, o meio suplementado com soro é importante para o desenvolvimento. A presença do soro no sistema de cultivo é muitas vezes relacionada com o aparecimento de problemas no desenvolvimento fetal e pós-natal (Thibault, 2003). Nesses experimentos, obtivemos o desenvolvimento de uma gestação gemelar, com fetos normais anatômica e

histologicamente, até 260 dias de gestação utilizando SVE no cultivo. Desta maneira, o meio SOF suplementado com SVE foi escolhido como padrão.

Em relação à origem da célula doadora, não observamos diferença significativa sobre as taxas de desenvolvimento *in vitro*, quando utilizamos animais diferentes como doadores de células e/ou tecidos diferentes doados pelo mesmo animal (Tabelas 8 e 9). Apesar de haver divergência na literatura em relação a melhores ou piores resultados de acordo com o tipo celular, autores como Campbell *et al.* (2007) afirmam que estas diferenças podem ser atribuídas aos métodos estatísticos utilizados, com a comparação entre a eficiência das mesmas sendo muito difícil.

Muitas vezes não dispomos de receptoras síncronas e próximas ao laboratório que viabilizem a transferência a fresco de todos os embriões produzidos por NTSC. Desta maneira, a criopreservação para posterior transferência, é uma estratégia importante a ser empregada. Em relação à criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* por transferência nuclear, os dados da literatura ainda são muito escassos. Tendo em vista que a eficiência da técnica por si só é muito baixa. Os processos que envolvem a produção de animais a partir de transferência nuclear, preferencialmente, usam embriões frescos (Pace *et al.*, 2002; Powell *et al.*, 2004; Panarace *et al.*, 2007). Isto acaba sendo mais uma dificuldade para a implementação a campo, uma vez que se faz necessária a disponibilidade de receptoras síncronas e relativamente próximas. Em nossos experimentos, alguns embriões foram transferidos a fresco, enquanto outros após vitrificação, com taxas iniciais de prenhez (dia 35) de 46,1% (6/13) e 63,6% (7/11), respectivamente.

Durante este trabalho, 1.123 estruturas foram reconstruídas em diferentes condições, sendo que 95 blastocistos foram produzidos, em 56 rotinas de clonagem. O primeiro blastocisto foi produzido na 5ª rotina. Após a transferência de parte destes embriões (24 TE), 13 prenhez foram estabelecidas. Entretanto, a maioria delas foi perdida com o decorrer do tempo. Uma prenhez gemelar alcançou os 260 dias e outra chegou a termo com o nascimento de um clone vivo.

6.1.1 Prenhez gemelar

A ocorrência de gêmeos idênticos nas diferentes espécies domésticas ocorre devido à divisão do embrião de maneira espontânea durante o desenvolvimento embrionário inicial. Entretanto, desde a década de 80, com a aplicação comercial da

transferência de embriões, vários técnicos vêm utilizando a técnica de bipartição nos estádios pré-implantação para a produção de gêmeos. Esta técnica utilizada em embriões produzidos *in vivo* não compromete a viabilidade de cada hemi-embrião em relação ao embrião original. Desta maneira, quando é dividido um embrião de boa qualidade e cada metade transferida para uma receptora, as chances de gestação dobram (Lopes *et al.*, 2001).

Neste trabalho, vitrificamos um embrião no estágio de blastocisto em eclosão produzido por transferência nuclear com célula somática. O embrião apresentava, aproximadamente, metade da massa celular dentro da zona pelúcida e a outra metade havia saído pelo orifício da micromanipulação (Figura 11). No procedimento do reaquecimento, o embrião foi diretamente transferido para uma palheta contendo a solução de diluição do crioprotetor e transferido, imediatamente, para a receptora, sem prévia avaliação morfológica. Em algum momento do processo de vitrificação, reaquecimento ou transferência, ocorreu a divisão espontânea do embrião.

6.2 Oócitos Bovinos como Citoplasma Receptor na NTSCi

Oócitos bovinos enucleados foram utilizados como receptores para o desenvolvimento *in vitro* de clones ovinos, caprinos e suínos.

As taxas de fusão não diferiram significativamente entre os grupos NTSCi e controle NTSC. As taxas de fusão do experimento NTSCi ovino foram de 90,2% no grupo bovino-bovino e 89,0% no grupo ovino-bovino (Tabela 13). No experimento NTSCi caprino as taxas de fusão foram de 85,3% no grupo bovino-bovino e 77,4% no grupo caprino-bovino (Tabela 15). Os complexos reconstruídos suíno-bovino apresentaram taxa de fusão de 79,4% (Tabela 17) e também não diferiram daquelas observadas no grupo controle bovino-bovino (83,8%). Estes dados corroboram alguns resultados publicados na literatura, em que as taxas de fusão entre os grupos interespecie e controle bovino-bovino se assemelham (Kitiyanant *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2005; Sansinena *et al.*, 2005). Entretanto, outros autores obtiveram taxas de fusão inferiores quando a célula utilizada era proveniente de outra espécie (Dominko *et al.*, 1999).

As taxas de clivagem observadas em todos os grupos interespecie ovino-bovino (Tabela 14), caprino-bovino (Tabela 16) e suíno-bovino (Tabela 18) também não diferiram dos grupos homoespecíficos (bovino-bovino), o que era esperado uma vez que

as primeiras divisões celulares, antes da ativação do genoma embrionário, não são controladas pelo núcleo (Dominko *et al.*, 1999). De qualquer maneira, isto mostra que as injúrias causadas pelo processo de clonagem, bem como, a qualidade intrínseca dos oócitos foi semelhante entre os grupos interespécie e homoespecífico.

As taxas de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto dos embriões ovino-bovino e bovino-bovino não apresentaram diferença significativa (10,3% e 15,4%, respectivamente). Dominko *et al.* (1999) também não observaram diferença significativa entre os grupos ovino-bovino e bovino-bovino, com taxas de blastocisto de 9,9% e 9,7% respectivamente. Hua *et al.* (2007) obtiveram taxas satisfatórias de blastocistos ovino-bovino (24,7%), entretanto, significativamente inferiores às aquelas observadas no grupo partenogênético.

No experimento NTSCi caprino, foi possível a produção de blastocisto caprino em citoplasma bovino diferente dos dados da literatura em que a produção de embriões clones caprino-bovino não havia sido possível (Sansinena *et al.*, 2005).

Quando utilizamos células suínas, os embriões não se desenvolveram além do estágio de 8-células. Isto nos mostra que, nas nossas condições, o núcleo doador não foi capaz de assumir o controle do desenvolvimento embrionário. Vários fatores podem estar relacionados a este fato. Um deles é a questão do meio de cultivo. Neste experimento nós utilizamos o meio NCSU23, amplamente utilizado para o cultivo de embriões suínos (Petters e Wells, 1993). Em experimento realizado com embriões partenogênicos bovinos (Tabela 4), o meio NCSU23 foi capaz de suportar o desenvolvimento até o estágio de blastocisto com eficiência semelhante ao meio SOF (meio padrão de cultivo de embriões bovinos nas nossas condições). Entretanto, nenhum experimento de produção *in vitro* de embriões suínos havia sido conduzido em nosso laboratório. Assim, talvez este meio necessite de algum ajuste em relação à sua suplementação em nossas condições para que possa suportar o desenvolvimento de embriões clones suínos. Outra possibilidade, para o insucesso, é a qualidade intrínseca dos oócitos utilizados neste experimento, uma vez que a taxa de clivagem do grupo controle foi de apenas 39,3%, diferente dos outros experimentos realizados neste trabalho, onde as taxas de clivagem de embriões clones observadas ficaram entre 60 e 80%.

A utilização de um meio de cultivo adequado a embriões interespécie pode ser determinante do sucesso da técnica. Alguns autores afirmam que o oócito bovino não é

capaz de suportar o desenvolvimento de embriões murinos, observando que os embriões produzidos não se desenvolviam além do estágio de 8-células (Arat *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004). Entretanto, outros autores demonstraram que o sucesso do desenvolvimento destes embriões murinos-bovinos estaria relacionado com o sistema de cultivo (Nieminem *et al.*, 2005). Eles compararam o desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSCi murinos-bovinos em meio de cultivo adequado ao desenvolvimento de embriões murinos (KSOM) com embriões cultivados em meio, usualmente, utilizado para o cultivo de embriões bovinos (SOF). O sistema utilizando o KSOM apresentou melhores taxas de desenvolvimento *in vitro* além de proporcionar o desenvolvimento até o estágio de mórula, entretanto, nenhum alcançou o estágio de blastocisto (Nieminem *et al.*, 2005). Desta maneira, o sistema de cultivo está diretamente relacionado com o sucesso da NTSCi.

6.3 Oócitos vitrificados como citoplasma receptor

Em nosso experimento, oócitos vitrificados antes da MIV foram capazes de suportar o desenvolvimento *in vitro* de embriões produzidos pela técnica de transferência nuclear.

Algumas estratégias de vitrificação vêm sendo empregadas com o objetivo de aumentar o número de estruturas vitrificadas, bem como de otimizar os sistemas de armazenamento, diminuindo o espaço que ocupam dentro do botijão de nitrogênio. No sentido de aumentar o número de estruturas vitrificadas, experimentos descrevem a utilização, como por exemplo, de grades de microscopia eletrônica (Martino *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 2001), *nylon mesh* (Matsumoto *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2005) e *plastic stiker* (Chian *et al.*, 2004) para vitrificar mais do que 10-15 oócitos. No mesmo sentido, utilizamos as palhetas em bisel, o que permitiu a vitrificação de 15 estruturas por palheta. O emprego de microgotas na parede da palheta em bisel associou as vantagens observadas na técnica da vitrificação em microgotas (Papis *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2007a), com a vantagem logística do armazenamento em palhetas, dispensando o uso de tubos para o armazenamento das mesmas. Além disto, o armazenamento em palhetas é de fácil manejo dentro dos botijões usualmente presentes nos laboratórios que executam técnicas de FIV/NT.

Do total de 908 complexos *cumuli*-oócitos vitrificados e reaquescidos neste novo sistema, 96,3% foram recuperados após o reaquescimento (dados não apresentados).

A taxa de recuperação dos oócitos vitrificados após o desnudamento, apresentada na Tabela 19, foi significativamente inferior àquela observada nos oócitos não vitrificados (73,0% vs 91,4%). Este dado demonstra que, de alguma maneira, o processo de vitrificação deixa a zona pelúcida mais susceptível à ruptura, provavelmente, devido a fraturas que muitas vezes ocorrem durante o processo de vitrificação (Shaw *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2007a). Como os oócitos são vitrificados, reaquecidos e maturados com células do *cumulus*, a visualização destas fraturas fica dificultada, e posteriormente se apresenta como uma maior fragilidade dos oócitos durante a remoção mecânica das células do *cumulus* durante a pipetagem.

A taxa de maturação nuclear muitas vezes é afetada pela vitrificação. Apesar de alguns autores terem obtido taxas de MII semelhantes entre os grupos vitrificados e controle frescos (Hurtt *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2005), vários autores referem redução nas taxas de maturação *in vitro* após a vitrificação: 71,3% vs 19,8% (Le Gal e Massip, 1999), 70% vs 20% (Matsumoto *et al.*, 2001) e 75,9% vs 29,5% (Yamada *et al.*, 2007). No nosso experimento (Tabela 20), a taxa de maturação do grupo controle (não vitrificado) foi de 65,8%, significativamente superior ao grupo vitrificado. Entretanto, 46,8 % dos oócitos vitrificados conseguiram retomar a meiose e eliminar o corpúsculo polar, o que pode ser considerado como um indicador confiável da sobrevivência.

O tempo de maturação empregado para oócitos vitrificados foi de 22 h, enquanto que o tempo de maturação dos oócitos não vitrificados foi de 17 h. Este tempo de 17 h foi determinado em função da proximidade do corpúsculo polar em relação a placa metafásica. Nas nossas condições, a partir de 18 h de maturação, mais de 50% dos oócitos apresentavam o corpúsculo polar distante da placa metafásica, o que dificulta o processo de micromanipulação, enquanto que com 17 h, esta taxa foi inferior a 20% (dados obtido em pré-experimentos anteriores com NT). Em relação aos oócitos vitrificados, mesmo com 22 h de maturação, a maioria dos PB se encontrava junto à placa metafásica. Este dado pode ser um indício de que a retomada da maturação, nos oócitos vitrificados é mais lenta.

As taxas de sobrevivência após a enucleação (Tabela 20) mostram que a sobrevivência à micromanipulação destes oócitos não é afetada pela criopreservação (77,8% vs 78,4%). Dados semelhantes a estes foram observados por outros autores que utilizaram oócitos vitrificados após a maturação (Dinnyes *et al.*, 2000; Atabay *et al.*, 2004; Tominaga *et al.*, 2005). Entretanto, oócitos congelados em MII foram mais

sensíveis à micromanipulação do que oócitos vitrificados antes da maturação (Kubota *et al.*, 1998). Este dado associado aos nossos resultados nos possibilita presumir que os oócitos criopreservados antes da maturação teriam o período da maturação para se reorganizar antes de serem submetidos à micromanipulação.

A criopreservação parece não afetar a fusão do citoplasto receptor com a célula doadora. As taxas de fusão obtidas no nosso experimento não diferiram entre os grupos vitrificados e frescos (82,1% vs 82,3%). Resultados semelhantes também foram obtidos por outros grupos que utilizaram oócitos ou citoplastos criopreservados com resultados de 53,2% vs 58,3% (Yang *et al.*, 2007a), 79% vs 72% (Tominaga *et al.*, 2005), 68,2% vs 67,2% (Atabay *et al.*, 2004), 62% vs 74% (Dinnyes *et al.*, 2000), 83,7% vs 79,8% (Booth *et al.*, 1999) e 88 % vs 84% (Kubota *et al.*, 1998)

Alguns autores obtiveram taxas de desenvolvimento *in vitro* significativamente inferiores no grupo vitrificado comparado ao controle fresco (Hou *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007a). Entretanto, as taxas de desenvolvimento ao estágio de blastocistos observadas no nosso experimento, na comparação dos grupos fresco e vitrificados, não apresentaram diferença significativa entre eles (Tabela 21), o que corrobora resultados obtidos por outros grupos que utilizaram oócitos vitrificados em MII (Dinnyes *et al.*, 2000; Atabay *et al.*, 2004). Cabe ressaltar que o comportamento de oócitos frente à criopreservação depende do *status* da maturação (Diez *et al.*, 2005) e as injúrias por estes sofridas podem comprometer de maneira diferente o desenvolvimento *in vitro*. Quando comparamos a vitrificação de oócitos maturados (MII) com oócitos imaturos (VG), observamos algumas diferenças no que diz respeito tanto às alterações ultraestruturais quanto à sobrevivência *in vitro*. Quando comparados ao controle não-vitrificado, tanto oócitos MII quanto VG apresentam uma redução no número de grânulos corticais. Entretanto, enquanto mais de 40% das mitocôndrias aparecem degeneradas nos oócitos MII, o aspecto das mesmas nos oócitos VG é normal após a MIV (Diez *et al.*, 2005). Em relação às taxas de desenvolvimento *in vitro* após FIV (clivagem e blastocisto), alguns autores mostram não haver diferença significativa entre oócitos vitrificados em MII e GV (Le Gal e Massip, 1999). Entretanto, outros trabalhos obtiveram melhores taxas de desenvolvimento *in vitro* em oócitos vitrificados após a maturação (Fuku *et al.*, 1995).

Trabalhos com microscopia eletrônica mostram que oócitos fixados e avaliados, imediatamente, após a vitrificação e reaquecimento apresentam várias alterações

morfológicas, sendo que algumas delas tendem a estar diminuídas ou mesmo desaparecer após algumas horas de cultivo *in vitro* (Hyttel *et al.*, 2000; Diez *et al.*, 2005). Quando utilizamos oócitos maturados para vitrificação, o único parâmetro prático que temos no momento da utilização para NT é o aspecto morfológico. Entretanto, se utilizarmos oócitos imaturos, somente empregaremos aqueles que apresentarem viabilidade suficiente para conseguir concluir a meiose, ou seja, chegar a MII, ainda que com algumas alterações cromossômicas. De qualquer maneira como o DNA será removido, estas alterações têm menor importância na clonagem do que na FIV. De maneira semelhante, as alterações nos grânulos corticais que porventura ocorrem; são menos importantes na NT do que na FIV, uma vez que não necessitam realizar o bloqueio da polispermia. Outras alterações, como as que ocorrem nas mitocôndrias, têm o tempo correspondente a MIV para se recompor antes de serem submetidas a um novo procedimento de manipulação, procedimento este que induz a formação de *clusters* de REL, mitocôndrias, além de gotas de lipídios (Greising e Jonas, 1999). Desta maneira, a utilização de oócitos vitrificados antes da MIV é uma alternativa para a utilização de grandes quantidades de oócitos obtidos de abatedouro para a clonagem, uma vez que o protocolo apresentado possibilita a criopreservação e armazenamento de grandes quantidades de oócitos. O período de MIV é útil para reorganização estrutural, além de favorecer a seleção dos viáveis através da extrusão do PB.

Além disto, experimentos envolvendo criopreservação de oócitos e embriões interespecie puderam ser desenvolvidos possibilitando a produção de embriões nestes experimentos. A otimização do sistema de produção de clones por transferência nuclear, em nosso laboratório permitiu a implementação da técnica com a padronização de diversos pontos cruciais para a obtenção de embriões clones *in vitro*, bem como proporcionou o desenvolvimento *in vivo* com o nascimento de um produto vivo.

7 CONCLUSÕES

Na primeira fase deste trabalho, de implementação da técnica e otimização das condições, conseguimos alcançar nosso objetivo principal que era o de produzir embriões transferíveis. Além disto, conseguimos estabelecer prenhez que puderam ser levadas a termo, inclusive com o nascimento de um produto. Durante esta fase, estabelecemos algumas condições que se tornaram padrão em nosso laboratório, tais como o uso de HSOF como meio de manipulação, ativação com o protocolo do 6DMAP e cultivo em meio SOF com SVE. Em relação ao tipo celular e ao animal doador, concluímos que foi possível a produção de blastocistos de todos os tecidos e animais testados. Entretanto, a avaliação da eficiência *in vivo* deve ser avaliada individualmente. Concluímos também que a criopreservação de embriões clones pode ser uma ferramenta útil para este tipo de embrião. Porém, a avaliação *in vivo* de um maior número de embriões se faz necessária.

Na segunda etapa do trabalho, avaliamos o potencial do citoplasma bovino em suportar o desenvolvimento *in vitro* de clones de diferentes espécies e concluímos que o citoplasma bovino foi capaz de suportar o desenvolvimento de embriões ovinos e caprinos. Entretanto, não foi capaz de suportar o desenvolvimento de embriões suínos, nas condições testadas.

Na terceira fase deste trabalho, pode-se concluir que a vitrificação de oócitos imaturos representa uma alternativa logística como fonte de citoplasma receptor na NTSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T., HOSHI, H. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development**. v. 61, p. 57-66, 2002.

ABE, Y., HARA, K., MATSUMOTO, H., KOBAYASHI, J., SASADA, H., EKWALL, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., SATO, E. Feasibility of a Nylon-Mesh Holder for Vitrification of Bovine Germinal Vesicle Oocytes in Subsequent Production of Viable Blastocysts. **Biology of Reproduction**. v. 72, p. 1416-1420, 2005.

ALBERIO, R., ZAKHARTCHENKO, V., MOTLIK, J., WOLF, E. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. **The International Journal of Developmental Biology**. v. 45, p. 797-809, 2001.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed., Artmed, Porto Alegre, 2004.

ARAT, S., RZUCIDLO, J., STICE, S.L. Gene expression and in vitro development of inter-species nuclear transfer embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 66, p. 334-342, 2003.

ASTON, K.I., LI, G.P., HICKS, B.A., SESSIONS, B.R., PATE, B.J., HAMMON, D., BUNCH, T.D., WHITE, K.L. Effect of the time interval between fusion and activation on nuclear state and development in vitro and in vivo of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Reproduction**. v. 131, p. 45-51, 2006.

ATABAY, E.C., TAKAHASHI, Y., KATAGIRI, S., NAGANO, M., KOGA, A., KANAI, Y. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. **Theriogenology**. v. 61, p. 15-23, 2004.

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**. v. 17, p. 456-461, 1999.

BATCHELDER, C.A., BERTOLINI, M., MASON, J.B., MOYER, A.L., HOFFERT, K.A., PETKOV, S.G., FAMULA, T.R., ANGELOS, J., GEORGE, L.W., ANDERSON, G.B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. **Cloning Stem Cells**. v. 9, p. 83-96, 2007a.

BATCHELDER, C.A., BERTOLINI, M., MASON, J.B., MOYER, A.L., HOFFERT, K.A., PETKOV, S.G., FAMULA, T.R., ANGELOS, J., GEORGE, L.W., ANDERSON, G.B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning Stem Cells**. v. 9, p. 63-82, 2007b.

BEN-YOSEF, D. & SHALGI, R. Early ionic events in activation of the mammalian egg. **Reviews of Reproduction**. v. 3, p. 96-103, 1998.

BHOJWANI, M., RUDOLPH, E., KANITZ, W., ZUEHLKE, H., SCHNEIDER, F., TOMEK, W. Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. **Cloning Stem Cells**. v. 8, p. 259-274, 2006.

BOOTH, P.J., VAJTA, G., HØJ, A., HOLM, P., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. **Theriogenology**. v. 51, p. 999-1006, 1999.

BOWLES, E.J., LEE, J.-H., ALBERIO, R., LLOYD, R.E.I., STEKEL, D., CAMPBELL, K.H.S., ST. JOHN, J.C. Contrasting Effects of in Vitro Fertilization and Nuclear Transfer on the Expression of mtDNA Replication Factors. **Genetics**. v. 176, p. 1511-1526, 2007.

BREM, G. & KÜHHOLZER, B. The Recent History of Somatic Cloning in Mammals. **Cloning and Stem Cells**. v. 4, p. 57-63, 2002.

BRIGGS, R. & KING, T.J. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**. v. 38, p. 455-463, 1952.

BUI, L.C., VIGNON, X., CAMPION, E., LALOY, E., LAVERGNE, Y., TY, L.V., NGUYEN, B.X., RENARD, J.P. Use of interspecies nuclear transfer to study the early embryonic development and nuclear activities of endangered species *Pseudoryx nghetinhensis*. **Theriogenology**. v. 57, p. 427, 2002.

CAMPBELL, K.H., MCWHIR, J., RITCHIE, W.A., WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**. v. 380, p. 64-66, 1996.

CAMPBELL, K.H. Ten years of cloning: questions answered and personal reflections. **Cloning Stem Cells**. v. 9, p. 8-11, 2007.

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**. v. 68, p. S214-S231, 2007.

CHANG, K.H., LIM, J.M., KANG, S.K., LEE, B.C., MOON, S.Y., HWANG, W.S. Blastocyst formation, karyotype, and mitochondrial DNA of interspecies embryos derived from nuclear transfer of human cord fibroblasts into enucleated bovine oocytes. **Fertility and Sterility**. v. 80, p. 1380-1387, 2003.

CHAVATTE-PALMER, P., HEYMAN, Y., RICHARD, C., MONGET, P., LEBOURHIS, D., KANN, G., CHILLIARD, Y., VIGNON, X., RENARD, J.P. Clinical, Hormonal, and Hematologic Characteristics of Bovine Calves Derived from Nuclei from Somatic Cells. **Biology Reproduction**. v. 66, p. 1596-1603, 2002.

CHAVATTE-PALMER, P., REMY, D., CORDONNIER, N., RICHARD, C., ISSENMAN, H., LAIGRE, P., HEYMAN, Y., MIALOT, J.-P. Health Status of Cloned Cattle at Different Ages. **Cloning and Stem Cells**. v. 6, p. 94-100, 2004.

CHEN, D.-Y., WEN, D.-C., ZHANG, Y.-P., SUN, Q.-Y., HAN, Z.-M., LIU, Z.-H., SHI, P., LI, J.-S., XIANGYU, J.-G., LIAN, L., KOU, Z.-H., WU, Y.-Q., CHEN, Y.-C., WANG, P.-Y., ZHANG, H.-M. Interspecies Implantation and Mitochondria Fate of Panda-Rabbit Cloned Embryos. **Biology of Reproduction**. v. 67, p. 637-642, 2002.

CHEN, T., ZHANG, Y.-L., JIANG, Y., LIU, J.-H., SCHATTEN, H., CHEN, D.-Y., SUN, Q.-Y. Interspecies nuclear transfer reveals that demethylation of specific repetitive sequences is determined by recipient ooplasm but not by donor intrinsic property in cloned embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 73, p. 313-317, 2006.

CHEN, Y., HE, Z.X., LIU, A., WANG, K., MAO, W.W., CHU, J.X., LU, Y., FANG, Z.F., SHI, Y.T., YANG, Q.Z., CHEN DA, Y., WANG, M.K., LI, J.S., HUANG, S.L., KONG, X.Y., SHI, Y.Z., WANG, Z.Q., XIA, J.H., LONG, Z.G., XUE, Z.G., DING, W.X., SHENG, H.Z. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. **Cell Research**. v. 13, p. 251-263, 2003.

CHESNE, P., ADENOT, P.G., VIGLIETTA, C., BARATTE, M., BOULANGER, L., RENARD, J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature Biotechnology**. v. 20, p. 366-369, 2002.

CHIAN, R.-C., KUWAYAMA, M., TAN, L., TAN, J., KATO, O., NAGAI, T. High Survival Rate of Bovine Oocytes Matured In Vitro Following Vitrification. **Journal of Reproduction and Development** v. 50, p. 685-696, 2004.

CHOI, T., AOKI, F., MORI, M., YAMASHITA, M., NAGAHAMA, Y., KOHMOTO, K. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. **Development**. v. 113, p. 789-795, 1991.

CIBELLI, J.B., STICE, S.L., GOLUEKE, P.J., KANE, J.J., JERRY, J., BLACKWELL, C., PONCE DE LEON, F.A., ROBL, J.M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**. v. 280, p. 1256-1258, 1998.

DESSEV, G., IOVCHEVA-DESSEV, C., BISCHOFF, J.R., BEACH, D., GOLDMAN, R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. **Journal of Cell Biology**. v. 112, p. 523-533, 1991.

DIEZ, C., DUQUE, P., GOMEZ, E., HIDALGO, C.O., TAMARGO, C., RODRIGUEZ, A., FERNANDEZ, L., VARGA, S.D.L., FERNANDEZ, A., FACAL, N., CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**. v. 64, p. 317-333, 2005.

DINNYES, A., DAI, Y., JIANG, S., YANG, X. High Developmental Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, In Vitro Fertilization, and Somatic Cell Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 513-518, 2000.

DO, J.T., LEE, J.W., LEE, B.Y., KIM, S.B., RYOO, Z.Y., LEE, H.T., CHUNG, K.S. Fate of Donor Mitochondrial DNA in Cloned Bovine Embryos Produced by Microinjection of Cumulus Cells. **Biology of Reproduction**. v. 67, p. 555-560, 2002.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**. v. 57, p. 285-302, 2002.

DOMINKO, T., MITALIPOVA, M., HALEY, B., BEYHAN, Z., MEMILI, E., MCKUSICK, B., FIRST, N.L. Bovine Oocyte Cytoplasm Supports Development of Embryos Produced by Nuclear Transfer of Somatic Cell Nuclei from Various Mammalian Species. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 1496-1502, 1999.

DOREE, M. & HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **Journal of Cell Science**. v. 115, p. 2461-2464, 2002.

EILERTSEN, K.J., POWER, R.A., HARKINS, L.L., MISICA, P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**. v. 98, p. 129-146, 2007.

ERBACH, G.T., LAWITTS, J.A., PAPAIOANNOU, V.E., BIGGERS, J.D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media [published erratum appears in Biol Reprod 1994 Aug;51(2):345]. **Biology of Reproduction**. v. 50, p. 1027-1033, 1994.

FAN, H.-Y. & SUN, Q.-Y. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. **Biology of Reproduction**. v. 70, p. 535-547, 2004.

FENG, Y.Q., DESPRAT, R., FU, H., OLIVIER, E., LIN, C.M., LOBELL, A., GOWDA, S.N., ALADJEM, M.I., BOUHASSIRA, E.E. DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. **PLoS Genet**. v. 2, p. e65, 2006.

FISSORE, R.A., HE, C.L., VANDE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**. v. 55, p. 1261-1270, 1996.

FISSORE, R.A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**. v. 124, p. 745-754, 2002a.

FISSORE, R.A., SMYTH, J., KUROKAWA, M., COLLAS, P. **Activation of Mammalian Oocytes**. In: Principles of Cloning. CIBELLI, J., *et al.* (coord.) 1a ed. San Diego: Academic Press, 2002b. p.21-45.

FOOTE, R.H. **Historical Perspective**. In: Principles of Cloning. CIBELLI, J., *et al.* (coord.) 1a ed. San Diego: Academic Press, 2002. p.3-18.

FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., LOPES, R.F.F., RODRIGUES, J.L. Produção in vitro de embriões bovinos em meio SOF com SVE ou BSA. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 41, p. 396-403, 2004.

FUKU, E., XIA, L., DOWNEY, B.R. Ultrastructural Changes in Bovine Oocytes Cryopreserved by Vitrification. **Cryobiology**. v. 32, p. 139-156, 1995.

GALLI, C., LAGUTINA, I., CROTTI, G., COLLEONI, S., TURINI, P., PONDERATO, N., DUCHI, R., LAZZARI, G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**. v. 424, p. 635, 2003.

GOMEZ, M.C., JENKINS, J.A., GIRALDO, A., HARRIS, R.F., KING, A., DRESSER, B.L., POPE, C.E. Nuclear Transfer of Synchronized African Wild Cat Somatic Cells into Enucleated Domestic Cat Oocytes. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 1032-1041, 2003.

GOMEZ, M.C., POPE, C.E., LYONS, L., COLE, A., LOPEZ, M., DUMAS, C., DRESSER, B.L. Improving the application of nuclear transfer for producing non-domestic felids. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 168, 2005.

GÓMEZ, M.C., POPE, C.E., GIRALDO, A., LYONS, L.A., HARRIS, R.F., KING, A.L., COLE, A., GODKE, R.A., DRESSER, B.L. Birth of African Wildcat Cloned Kittens Born from Domestic Cats. **Cloning and Stem Cells**. v. 6, p. 247-258, 2004.

GONG, G., DAI, Y., FAN, B., ZHU, H., ZHU, S., WANG, H., WANG, L., TANG, B., LI, R., WAN, R., LIU, Y., HUANG, Y., ZHANG, L., SUN, X., LI, N. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**. v. 69, p. 278-288, 2004.

GORDON, I.R. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. second edition ed., CABI Publishing, Cambridge. p 548, 2003.

GREEN, A.L., WELLS, D.N., OBACK, B. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. **Biology of Reproduction**. v. 77, p. 395-406, 2007.

GREISING, T. & JONAS, L. The influence of enucleation on the ultrastructure of in vitro matured and enucleated cattle oocytes. **Theriogenology**. v. 52, p. 303-312, 1999.

GURDON, J.B. & BYRNE, J.A. The first half-century of nuclear transplantation. **Bioscience Reports**. v. 24, p. 545-557, 2004.

HAMANO, S., KOIKEDA, A., KUWAYAMA, M., NAGAI, T. Full-term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 38, p. 1085-1090, 1992.

HANSEN, D.V., POMERENING, J.R., SUMMERS, M.K., MILLER, J.J., FERRELL, J.E., JR., JACKSON, P.K. Emi2 at the crossroads: where CSF meets MPF. **Cell Cycle**. v. 6, p. 732-738, 2007.

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**. v. 66, p. 6-13, 2002.

HILL, J.R. & CHAVATTE-PALMER, P. **Pregnancy and neonatal care of cloned animals**. In: Principles of Cloning. JOSE, C., *et al.* (coord.) 1a ed. San Diego: Academic Press, 2002. p.247-266.

HÖLKER, M., PETERSEN, B., HASSEL, P., KUES, W.A., LEMME, E., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H. Duration of In Vitro Maturation of Recipient Oocytes Affects Blastocyst Development of Cloned Porcine Embryos. **Cloning and Stem Cells**. v. 7, p. 35-44, 2005.

HOSSEINI, S.M., HAJIAN, M., MOULAVI, F., SHAHVERDI, A.H., NASR-ESFAHANI, M.H. Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**. v. In Press, Corrected Proof, 2007.

HOU, Y.P., DAI, Y.P., ZHU, S.E., ZHU, H.B., WU, T.Y., GONG, G.C., WANG, H.P., WANG, L.L., LIU, Y., LI, R., WAN, R., LI, N. Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. **Theriogenology**. v. 64, p. 1381-1391, 2005.

HUA, S., ZHANG, Y., SONG, K., SONG, J., ZHANG, Z., ZHANG, L., ZHANG, C., CAO, J., MA, L. Development of bovine-ovine interspecies cloned embryos and mitochondria segregation in blastomeres during preimplantation. **Animal Reproduction Science**. v. In Press, Corrected Proof, 2007.

HURTT, A.E., LANDIM-ALVARENGA, F., SCIDEL, J.G.E., SQUIRES, E.L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**. v. 54, p. 119-128, 2000.

HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v. 47, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, P., VAJTA, G., CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: Ultrastructural consequences. **Molecular Reproduction and Development**. v. 56, p. 80-88, 2000.

ILLMENSEE, K. & HOPPE, P.C. Nuclear transplantation in mus musculus: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**. v. 23, p. 9-18, 1981.

ILLMENSEE, K., LEVANDUSKI, M., ZAVOS, P.M. Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. **Fertility and Sterility**. v. 85, p. 1248-1260, 2006.

JANG, G., PARK, E.-S., CHO, J.-K., BHUIYAN, M.M.U., LEE, B.-C., KANG, S.-K., HWANG, W.-S. Preimplantation embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. **Theriogenology**. v. 62, p. 512-521, 2004.

JANSSEN, D.L., EDWARDS, M.L., KOSTER, J.A., LANZA, R.P., RYDER, O.A. Postnatal management of chryptorchid banteng calves cloned by nuclear transfer utilizing frozen fibroblast cultures and enucleated cow ova. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 16, p. 224, 2004.

JIANG, Y., CHEN, T., NAN, C.L., OUYANG, Y.C., SUN, Q.Y., CHEN, D.Y. In vitro culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos. **Zygote**. v. 13, p. 233-240, 2005.

KANKA, J., HOZAK, P., HEYMAN, Y., CHESNE, P., DEGROLARD, J., RENARD, J.P., FLECHON, J.E. Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v. 43, p. 135-144, 1996.

KASINATHAN, P., KNOTT, J.G., MOREIRA, P.N., BURNSIDE, A.S., JOSEPH JERRY, D., ROBL, J.M. Effect of Fibroblast Donor Cell Age and Cell Cycle on

Development of Bovine Nuclear Transfer Embryos In Vitro. **Biology of Reproduction**. v. 64, p. 1487-1493, 2001.

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**. v. 282, p. 2095-2098, 1998.

KIM, M.K., JANG, G., OH, H.J., YUDA, F., KIM, H.J., HWANG, W.S., HOSSEIN, M.S., KIM, J.J., SHIN, N.S., KANG, S.K., LEE, B.C. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. **Cloning Stem Cells**. v. 9, p. 130-137, 2007.

KIM, N.H., SHIN, M.R., PARK, S.H. Bovine oocyte cytoplasm supports nuclear remodeling but not reprogramming of murine fibroblast. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 16, p. 145-146, 2004.

KITIYANANT, Y., SAIKHUN, J., CHAISALEE, B., WHITE, K.L., PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic Cell Cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): Effects of Interspecies Cytoplasmic Recipients and Activation Procedures. **Cloning and Stem Cells**. v. 3, p. 97-104, 2001.

KUBOTA, C., YANG, X., DINNYES, A., TODOROKI, J., YAMAKUCHI, H., MIZOSHITA, K., INOHAE, S., TABARA, N. In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. **Molecular Reproduction and Development**. v. 51, p. 281-286, 1998.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, p. 990-995, 2000.

LANZA, R.P., CIBELLI, J.B., DIAZ, F., MORAES, C.T., FARIN, P.W., FARIN, C.E., HAMMER, C.J., WEST, M.D., DAMIANI, P. Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) Using Interspecies Nuclear Transfer. **Cloning and Stem Cells**. v. 2, p. 79-90, 2000.

LAOWTAMMATHRON, C., LORTHONGPANICH, C., KETUDAT-CAIRNS, M., HOCHI, S., PARNPAI, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology**. v. 64, p. 1185-1196, 2005.

LE GAL, F. & MASSIP, A. Cryopreservation of Cattle Oocytes: Effects of Meiotic Stage, Cycloheximide Treatment, and Vitrification Procedure. **Cryobiology**. v. 38, p. 290-300, 1999.

LEE, B., WIRTU, G.G., DAMIANI, P., POPE, E., DRESSER, B.L., HWANG, W., BAVISTER, B.D. Blastocyst Development after Intergeneric Nuclear Transfer of

Mountain Bongo Antelope Somatic Cells into Bovine Oocytes. **Cloning and Stem Cells**. v. 5, p. 25-33, 2003.

LEE, B.C., KIM, M.K., JANG, G., OH, H.J., YUDA, F., KIM, H.J., HOSSEIN, M.S., KIM, J.J., KANG, S.K., SCHATTEN, G., HWANG, W.S. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**. v. 436, p. 641, 2005.

LI, Y., DAI, Y., DU, W., ZHAO, C., WANG, H., WANG, L., LI, R., LIU, Y., WAN, R., LI, N. Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine. **Molecular Reproduction and Development**. v. 73, p. 189-195, 2006a.

LI, Y., DAI, Y., DU, W., ZHAO, C., WANG, L., WANG, H., LIU, Y., LI, R., LI, N. In vitro development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**. v. 101, p. 45-59, 2007.

LI, Z., SUN, X., CHEN, J., LIU, X., WISELY, S.M., ZHOU, Q., RENARD, J.P., LENO, G.H., ENGELHARDT, J.F. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. **Developmental Biology**. v. 293, p. 439-448, 2006b.

LLOYD, R.E., LEE, J.-H., ALBERIO, R., BOWLES, E.J., RAMALHO-SANTOS, J., CAMPBELL, K.H.S., ST. JOHN, J.C. Aberrant Nucleo-cytoplasmic Cross-Talk Results in Donor Cell mtDNA Persistence in Cloned Embryos. **Genetics**. v. 172, p. 2515-2527, 2006.

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

LOPES, R.F., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. **Theriogenology**. v. 56, p. 1383-1392, 2001.

LORTHONGPANICH, C., LAOWTAMMATHRON, C., MUENTHAISONG, S., VETCHAYAN, T., KETUDAT-CAIRNS, M., LIKITDECHAROTE, B., PARNPAI, R. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 16, p. 149, 2004.

LU, F., SHI, D., WEI, J., YANG, S., WEI, Y. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). **Theriogenology**. v. 64, p. 1309-1319, 2005.

MADDOX-HYTTEL, P., SVARCOVA, O., LAURINCIK, J. Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. **Theriogenology**. v. 68 Suppl 1, p. S63-70, 2007.

MADGWICK, S. & JONES, K.T. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. **Cell Division**. v. 2, p. 4, 2007.

MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 30, p. 630-641, 2005.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra- rapid cooling. **Biology of Reproduction**. v. 54, p. 1059-1069, 1996.

MARX, J.L. Swiss research questioned. **Science**. v. 220, p. 1023, 1983a.

MARX, J.L. Bar Harbor investigation reveals no fraud. **Science**. v. 220, p. 1254, 1983b.

MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. **Reproduction Nutrition Development**. v. 43, p. 325-330, 2003.

MATSHIKIZA, M., BARTELS, P., VAJTA, G., OLIVER, F., SPIES, T., BARTELS, G.E., HARLEY, E.H., BAUMGARTEN, I., CALLESEN, H. Embryo development following interspecies nuclear transfer of African buffalo (*Syncerus caffer*), bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*) and eland (*Taurotragus oryx*) somatic cells into bovine cytoplasm. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 16, p. 150-151, 2004.

MATSUMOTO, H., JIANG, J.Y., TANAKA, T., SASADA, H., SATO, E. Vitrification of Large Quantities of Immature Bovine Oocytes Using Nylon Mesh. **Cryobiology**. v. 42, p. 139-144, 2001.

MEINECKE, B. & KRISCHEK, C. MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus-enclosed pig oocytes. **Zygote**. v. 11, p. 7-16, 2003.

MEIRELLES, F.V., BORDIGNON, V., WATANABE, Y., WATANABE, M., DAYAN, A., LOBO, R.B., GARCIA, J.M., SMITH, L.C. Complete Replacement of the Mitochondrial Genotype in a *Bos indicus* Calf Reconstructed by Nuclear Transfer to a *Bos taurus* Oocyte. **Genetics**. v. 158, p. 351-356, 2001.

MEN, H., MONSON, R.L., PARRISH, J.J., RUTLEDGE, J.J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**. v. 64, p. 245-250, 2003.

MIYOSHI, K., RZUCIDLO, S.J., PRATT, S.L., STICE, S.L. Improvements in Cloning Efficiencies May Be Possible by Increasing Uniformity in Recipient Oocytes and Donor Cells. **Biology of Reproduction**. v. 68, p. 1079-1086, 2003.

MORGAN, H.D., SANTOS, F., GREEN, K., DEAN, W., REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**. v. 14 Spec No 1, p. R47-58, 2005.

MOTLIK, J., PAVLOK, A., KUBELKA, M., KALOUS, J., KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**. v. 49, p. 461-469, 1998.

MURAKAMI, M., OTOI, T., WONGSRIKEAO, P., AGUNG, B., SAMBUU, R., SUZUKI, T. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. **Cloning Stem Cells**. v. 7, p. 77-81, 2005.

NEWMARK, P. Geneva and Bar Harbor labs to check results. **Nature**. v. 303, p. 363, 1983.

NGUYEN, B.X., SOTOMARU, Y., TANI, T., KATO, Y., TSUNODA, Y. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. **Theriogenology**. v. 53, p. 1439-1448, 2000.

NIEMINEM, P.M., AHO, M., KANANEN-ANTTILA, K., REINIKAINEN, E., HALMEKYTÖ, M. Handmade cloning in trans-species NT: culture medium has an affect on the ability of reconstructed bovine-murine embryos to develop beyond the 8-cel stage. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 179, 2005.

NUMCHAIKRIKA, P., RUNGSIWIWUT, R., THONGPHAKDEE, A., TECHAKUMPHU, M. A preliminar study of the in vitro development os asian elephant, cloned embryos, reconstructed using a rabbit recipient oocyte. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 179, 2005.

OH, B.C., KIM, J.T., SHIN, N.S., KWON, S.W., KANG, S.K., LEE, B.C., HWANG, W.S. Production of blastocysts after intergeneric nuclear transfer of goral (*Naemorhedus goral*) somatic cells into bovine oocytes. **Journal Veterinary Medical Science**. v. 68, p. 1167-1171, 2006.

OLIVEIRA, A.T.D., LOPES, R.F.F., RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. **Theriogenology**. v. 64, p. 1559-1572, 2005.

PACE, M.M., AUGENSTEIN, M.L., BETTHAUSER, J.M., CHILDS, L.A., EILERTSEN, K.J., ENOS, J.M., FORSBERG, E.J., GOLUEKE, P.J., GRABER, D.F., KEMPER, J.C., KOPPANG, R.W., LANGE, G., LESMEISTER, T.L., MALLON, K.S., MELL, G.D., MISICA, P.M., PFISTER-GENSKOW, M., STRELCHENKO, N.S.,

VOELKER, G.R., WATT, S.R., BISHOP, M.D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**. v. 67, p. 334-339, 2002.

PANARACE, M., AGUERO, J.I., GARROTE, M., JAUREGUI, G., SEGOVIA, A., CANE, L., GUTIERREZ, J., MARFIL, M., RIGALI, F., PUGLIESE, M., YOUNG, S., LAGIOIA, J., GARNIL, C., FORTE PONTES, J.E., ERENO JUNIO, J.C., MOWER, S., MEDINA, M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**. v. 67, p. 142-151, 2007.

PAPIS, K., SHIMIZU, M., IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**. v. 54, p. 651-658, 2000.

PARK, S.-H., SHIN, M.-R., KIM, N.-H. Bovine oocyte cytoplasm supports nuclear remodeling but not reprogramming of murine fibroblast cells. **Molecular Reproduction and Development**. v. 68, p. 25-34, 2004.

PETTERS, R.M. & WELLS, K.D. Culture of pig embryos. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 48, p. 61-73, 1993.

POLEJAEVA, I.A., CHEN, S.H., VAUGHT, T.D., PAGE, R.L., MULLINS, J., BALL, S., DAI, Y., BOONE, J., WALKER, S., AYARES, D.L., COLMAN, A., CAMPBELL, K.H. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**. v. 407, p. 86-90, 2000.

POWELL, A.M., TALBOT, N.C., WELLS, K.D., KERR, D.E., PURSEL, V.G., WALL, R.J. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**. v. 71, p. 210-216, 2004.

REGHA, K., SLOANE, M.A., HUANG, R., PAULER, F.M., WARCZOK, K.E., MELIKANT, B., RADOLF, M., MARTENS, J.H.A., SCHOTTA, G., JENUWEIN, T., BARLOW, D.P. Active and Repressive Chromatin Are Interspersed without Spreading in an Imprinted Gene Cluster in the Mammalian Genome. **Molecular Cell**. v. 27, p. 353-366, 2007.

RHO, G.J., KIM, S., YOO, J., BALASUBRAMANIAN, S., LEE, H.J., CHOE, S.Y. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v. 63, p. 464-470, 2002.

SANSINENA, M., LYNN, J., DENNISTON, R., GODKE, R. Ooplasmic transfer after interspecies nuclear transfer: presence of foreign mitochondria, pattern of migration, and effect on embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 182, 2005.

SAUNDERS, C.M., LARMAN, M.G., PARRINGTON, J., COX, L.J., ROYSE, J., BLAYNEY, L.M., SWANN, K., LAI, F.A. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca $^{2+}$

oscillations in eggs and embryo development. **Development**. v. 129, p. 3533-3544, 2002.

SCHNIEKE, A.E., KIND, A.J., RITCHIE, W.A., MYCOCK, K., SCOTT, A.R., RITCHIE, M., WILMUT, I., COLMAN, A., CAMPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**. v. 278, p. 2130-2133, 1997.

SHAW, J.M., ORANRATNACHAI, A., TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**. v. 53, p. 59-72, 2000.

SHEN, P.C., LEE, S.N., LIU, B.S., CHU, F.H., WANG, C.H., WU, J.S., LIN, H.H., CHENG, W.T. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**. v. In Press, Corrected Proof, 2007.

SHIN, T., KRAEMER, D., PRYOR, J., LIU, L., RUGILA, J., HOWE, L., BUCK, S., MURPHY, K., LYONS, L., WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**. v. 415, p. 859, 2002.

SMITH, L.C., THUNDATHIL, J., FILION, F. Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 15-22, 2005.

ST JOHN, J.C., LLOYD, R.E.I., BOWLES, E.J., THOMAS, E.C., EL SHOURBAGY, S. The consequences of nuclear transfer for mammalian foetal development and offspring survival. A mitochondrial DNA perspective. **Reproduction**. v. 127, p. 631-641, 2004.

STEINBORN, R., SCHINOGL, P., WELLS, D.N., BERGTHALER, A., MULLER, M., BREM, G. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* Mitochondrial DNAs in Nuclear Transfer-Derived Somatic Cattle Clones. **Genetics**. v. 162, p. 823-829, 2002.

SU, L., DU, F.L., SUNG, S., YANG, S., JEONG, B.S., CASINGHINO, S., NEDAMBALE, T.L., XU, J., TIAN, C.X., YANG, X., JI, W. In vitro development of yak (*Poephagus mutus*) cloned embryos by interspecies somatic nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17, p. 183, 2005.

TANIGUCHI, M., IKEDA, A., ARIKAWA, E., WONGSRIKEAO, P., AGUNG, B., NAOI, H., NAGAI, T., OTOI, T. Effect of cryoprotectant composition on in vitro viability of in vitro fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw dilution. **Journal of Reproduction and Development**. v. 53, p. 963-969, 2007.

TECIRLIOGLU, R.T., FRENCH, A.J., LEWIS, I.M., VAJTA, G., KORFIATIS, N.A., HALL, V.J., RUDDOCK, N.T., COONEY, M.A., TROUNSON, A.O. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 15, p. 361-366, 2003.

TERVIT, H.R., WHITTINGHAM, D.G., ROWSON, L.E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 30, p. 493-497, 1972.

THIBAUT, C. Recent data on the development of cloned embryos derived from reconstructed eggs with adult cells. **Reproduction Nutrition Development**. v. 43, p. 303-324, 2003.

THONGPHAKDEE, A., NUMCHAIKRIKA, P., OMSONGKRAM, S., CHATDARONG, K., KAMOLNORRANATH, S., DUMNUI, S., TECHAKUMPHU, M. In vitro development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 41, p. 219-226, 2006.

TOMINAGA, K., HAMADA, Y., HOCHI, S. Gel-Loading Tip Vitrification of In Vitro-Matured Bovine Oocytes and Subsequent Embryo Production by IVF and Nuclear Transfer. **Journal of Mammalian Ova Research**. v. 22, p. 178-184, 2005.

URAKAWA, M., IDETA, A., SAWADA, T., AOYAGI, Y. Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. **Theriogenology**. v. 62, p. 714-728, 2004.

VIEIRA, A., FORELL, F., FELTRIN, C., RODRIGUES, J. Calves Born after Direct Transfer of Vitrified Bovine In Vitro-produced Blastocysts Derived from Vitrified Immature Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals** v. Article in Press, Corrected Proof, 2008.

VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., LEHMKUHL, R.C., RUBIN, M.I.B., VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**. v. 45, p. 91-94, 2002.

VIEIRA, A.D., FORELL, F., FELTRIN, C., RODRIGUES, J.L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**. v. 99, p. 377-383, 2007.

VOGEL, G. Cloned Gaur a Short-Lived Success. **Science**. v. 291, p. 409, 2001.

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**. v. 394, p. 369-374, 1998.

WANG, Z.-G., WANG, W., YU, S.-D., XU, Z.-R. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal Reproduction Science**. v. In Press, Corrected Proof, 2007.

WELLS, D.N., MISICA, P.M., TERVIT, H.R. Production of Cloned Calves Following Nuclear Transfer with Cultured Adult Mural Granulosa Cells. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 996-1005, 1999.

WELLS, D.N., FORSYTH, J.T., MCMILLAN, V., OBACK, B. The Health of Somatic Cell Cloned Cattle and Their Offspring. **Cloning and Stem Cells**. v. 6, p. 101-110, 2004.

WELLS, D.N. Animal cloning: problems and prospects. **Rev Sci Tech**. v. 24, p. 251-264, 2005.

WEN, D.-C., YANG, C.-X., CHENG, Y., LI, J.-S., LIU, Z.-H., SUN, Q.-Y., ZHANG, J.-X., LEI, L., WU, Y.-Q., KOU, Z.-H., CHEN, D.-Y. Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloned cat (*Felis catus*) embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 66, p. 38-45, 2003.

WILLADSEN, S.M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. **Nature**. v. 277, p. 298-300, 1979.

WILLADSEN, S.M. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. **J Embryol Exp Morphol**. v. 65, p. 165-172, 1981.

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

WILLIAMS, C.J. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. **Human Reproduction Update**. v. 8, p. 313-321, 2002.

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

WILMUT, I., CAMPBELL, K., TUDGE, C. **Dolly, a segunda criação**. Editora Objetiva, Rio de Janeiro. p 394, 2000.

WOODS, G.L., WHITE, K.L., VANDERWALL, D.K., LI, G.P., ASTON, K.I., BUNCH, T.D., MEERDO, L.N., PATE, B.J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science**. v. 301, p. 1063, 2003.

XU, Z., KOPF, G.S., SCHULTZ, R.M. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in early and late events of mouse egg activation. **Development**. v. 120, p. 1851-1859, 1994.

XUE, F., TIAN, X.C., DU, F., KUBOTA, C., TANEJA, M., DINNYES, A., DAI, Y., LEVINE, H., PEREIRA, L.V., YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**. v. 31, p. 216-220, 2002.

YAMADA, C., CAETANO, H.V.A., SIMOES, R., NICACIO, A.C., FEITOSA, W.B., ASSUMPCAO, M.E.O.A., VISINTIN, J.A. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**. v. 99, p. 384-388, 2007.

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

YANG, B.-C., IM, G.-S., KIM, D.-H., YANG, B.-S., OH, H.-J., PARK, H.-S., SEONG, H.-H., KIM, S.-W., KA, H.-H., LEE, C.-K. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**. v. 103, p. 25-37, 2007a.

YANG, C.-X., HAN, Z.-M., WEN, D.-C., SUN, Q.-Y., ZHANG, K.-Y., ZHANG, L.-S., WU, Y.-Q., KOU, Z.-H., CHEN, D.-Y. In vitro development and mitochondrial fate of macaca-rabbit cloned embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 65, p. 396-401, 2003.

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, p. 295-302, 2007b.

YIN, X., LEE, Y., LEE, H., KIM, N., KIM, L., SHIN, H., KONG, I. In vitro production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silvestris catus*) enucleated oocytes. **Theriogenology**. v. 66, p. 275-282, 2006a.

YIN, X.J., LEE, Y.H., JIN, J.Y., KIM, N.H., KONG, I.K. Nuclear and microtubule remodeling and in vitro development of nuclear transferred cat oocytes with skin fibroblasts of the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and leopard cat (*Prionailurus bengalensis*). **Animal Reproduction Science**. v. 95, p. 307-315, 2006b.

ZHAO, Z.J., OUYANG, Y.C., NAN, C.L., LEI, Z.L., SONG, X.F., SUN, Q.Y., CHEN, D.Y. Rabbit oocyte cytoplasm supports development of nuclear transfer embryos derived from the somatic cells of the camel and Tibetan antelope. **Journal of Reproduction and Development**. v. 52, p. 449-459, 2006.

ZHAO, Z.J., LI, R.C., CAO, H.H., ZHANG, Q.J., JIANG, M.X., OUYANG, Y.C., NAN, C.L., LEI, Z.L., SONG, X.F., SUN, Q.Y., CHEN, D.Y. Interspecies nuclear transfer of Tibetan antelope using caprine oocyte as recipient. **Molecular Reproduction and Development**. v. 74, p. 412-419, 2007.

ZHOU, Q., RENARD, J.P., LE FRIEC, G., BROCHARD, V., BEAUJEAN, N., CHERIFI, Y., FRAICHARD, A., COZZI, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**. v. 302, p. 1179, 2003.

APÊNDICE A – Meio para transporte de ovários

Solução Fisiológica

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração (g/L)
NaCl	Merck	1.06404.1000	8,00
Penicilina e estreptomicina	Jofadel	Agrodel	0,15

APÊNDICE B – Meio para manipulação dos ovários

PBS

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração (g/L)
NaCl	Merck	1.06404.1000	8,00
KCl	Merck	1.04936.1000	0,20
MgCl ₂ .6H ₂ O	Merck	1.05833.1000	0,10
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	1.02382.1000	0,13
Glicose	Merck	1.08337.1000	1,09
Penicilina e estreptomicina	Jofadel	Agrodel	0,15
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	0,03
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Merck	1.06586.0500	1,25
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Merck	1.06346.1000	0,17
KH ₂ PO ₄	Sigma	1.04873.1000	0,15

Osmolaridade: 280-290 mOsm

pH: 7,1-7,2

APÊNDICE C – Meio TCM-HEPES

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
TCM199	Sigma	M2520	-	-
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	2,4 mM
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110,04	0,2 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL
BSA fração V	Gibco	11018-017	-	1 mg/mL

Osmolaridade: 275-285 mOsm

pH: 7,1 e 7,2

APÊNDICE D – Meio para cultivo celular
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
DMEM	HyClone	SH30003.01	-	-
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	25,0 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL
MEM aminoácidos	Sigma	M7145	-	1%
β-Mercaptoetanol	Sigma	M7522	78,13	1,0 mM
Soro fetal bovino	Nutricell	-	-	10%

Osmolaridade: 280-300 mOsm

pH: 7,2-7,4

APÊNDICE E– Meio para tripsinização das células

Trypsina Versene (VT)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração (g/L)
NaCl	Merck	1.06404.1000	8,00
KCl	Merck	1.04936.1000	0,40
Glicose	Merck	1.08337.1000	1,00
NaHCO ₃	Sigma	S5761	0,58
Trypsina 1:250	Sigma	85450C	0,50
EDTA	Sigma	E6758	0,20
Vermelho de Fenol	Sigma	P5530	0,0025
Penicilina e estreptomicina	Jofadel	Agrodel	0,15

pH: 7,2-7,4

APÊNDICE F – Meio SOF-HEPES (HSOF)

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
NaCl	Sigma	S5886	58,44	119,40 mM
KCl	Sigma	P5405	74,55	7,16 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902	147,01	1,71 mM
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655	136,09	1,19 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M2393	203,3	0,49 mM
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	5,00 mM
Glicose	Sigma	G6152	180,16	1,50 mM
Lactato de Sódio	Sigma	L1375	112,06	2,00 mM
Vermelho de fenol	Sigma	P5530	376,36	10 µg/mL
HEPES	Sigma	H6147	238,3	20,00 mM
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110,04	0,33 mM
L-Glutamina	Sigma	G5763	146,14	1,00 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL
BME aminoácidos	Sigma	B6766	-	2%
MEM aminoácidos	Sigma	M7145	-	1%
BSA fração V	Gibco	11018-017	-	2 mg/mL

Osmolaridade: 270-280 mOsm

pH: 7,2-7,3

APÊNDICE G – Meio de maturação *in vitro* - TCM199

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
TCM199	Sigma	M2520	-	-
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	26,19 mM
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110,04	0,2 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL
Soro de vaca em estro	-	-	-	10%
Estradiol	Sigma	E8875	-	1 µg/mL
FSH	Vetrepharm	Folltropin V	-	0,5 µg/mL
hCG	Serono	Profasi	-	0,03 UI/mL

Osmolaridade: 280-300 mOsm

pH: 7,3-7,4

APÊNDICE H – Meio de fusão

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
Manitol	Sigma	M1902	182,2	260 mM
MgSO ₄	Sigma	M2643	120,4	0,1 mM
BSA fração V	Gibco	11018-017	-	0,5 mg/mL

Osmolaridade: 260 mOsm

APÊNDICE I – Meio de cultivo embrionário NCSU23

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
NaCl	Sigma	S5886	58,44	108,73 mM
KCl	Sigma	P5405	74,55	4,78 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902	147,01	1,70 mM
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655	136,09	1,19 mM
MgSO ₄	Sigma	M2643	120,4	1,19 mM
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	25,07 mM
Lactato de Sódio	Sigma	L1375	112,06	2,00 mM
Vermelho de fenol	Sigma	P5530	376,36	10 µg/mL
Glicose*	Sigma	G6152	180,16	2,00 mM
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110,04	0,20 mM
L-Glutamina	Sigma	G5763	146,14	1,00 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL
Taurina	Sigma	T7146	125,15	7,00 mM
Hipotaurina	Sigma	H1384	109,15	5,00 mM

*Glicose adicionada 60 h após o início do cultivo

Osmolaridade: 270-280 mOsm

pH: 7,3-7,4

APÊNDICE J – Meio de cultivo embrionário SOF

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
NaCl	Sigma	S5886	58,44	107,70 mM
KCl	Sigma	P5405	74,55	7,16 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902	147,01	1,71 mM
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655	136,09	1,19 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M2393	203,3	0,49 mM
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	25,07 mM
Glicose	Sigma	G6152	180,16	1,50 mM
Lactato de Sódio	Sigma	L1375	112,06	1,50 mM
Vermelho de fenol	Sigma	P5530	376,36	10 µg/mL
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110,04	0,33 mM
L-Glutamina	Sigma	G5763	146,14	1,00 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL
BME aminoácidos	Sigma	B6766	-	2%
MEM aminoácidos	Sigma	M7145	-	1%

Osmolaridade: 270-280 mOsm

pH: 7,3-7,4

APÊNDICE K – Meio de cultivo embrionário KSOM

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
NaCl	Sigma	S5886	58,44	95,00 mM
KCl	Sigma	P5405	74,55	2,50 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902	147	1,71 mM
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655	136,1	0,35 mM
MgSO ₄	Sigma	M2643	120,4	0,20 mM
NaHCO ₃	Sigma	S5761	84,01	25 mM
Glicose	Sigma	G6152	180,2	0,20 mM
Lactato de Sódio	Sigma	L1375	112,1	10,00 mM
Vermelho de fenol	Sigma	P5530	376,4	10 µg/mL
HEPES	Sigma	H6147	238,3	25,00 mM
EDTA	Sigma	E6758	292,2	0,01 mM
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110	0,20 mM
L-Glutamina	Sigma	G5763	146,1	1,00 mM
Gentamicina	Sigma	G1264	-	50 µg/mL

Osmolaridade: 270-280 mOsm

pH: 7,3-7,4

APÊNDICE L – Evolução clínica do clone

O clone nasceu por cesariana e os cuidados neonatais iniciaram imediatamente após o nascimento e foram realizados de maneira intensiva durante as 42 h de vida do animal.

Antes da realização da cesariana, foi realizado o exame clínico da receptora, onde foi observado: frêmito da artéria uterina presente; relaxamento do ligamento sacro-isquiático; úbere distendido apresentando secreção (colostró); placentônios com tamanho aparentemente normal; estruturas umbilicais normais; feto com grande atividade (movimento) e sinais de partição evidente e iminente.

O clone nasceu às 16 h e 50 min, do dia 26 de janeiro de 2007, aos 290 dias de gestação pesando 25kg. Realizou-se o exame clínico, incluindo a pesquisa de deformações congênitas, verificação da função intestinal e urinária, além do constante acompanhamento da temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória do animal. Não houve sofrimento fetal e não havia sinais de asfixia aparentes.

Imediatamente após o nascimento, o animal foi suspenso, pelos membros posteriores, por cordas e através de movimentos pendulares promoveu-se a eliminação de líquidos presentes nas vias aéreas superiores. A aspiração do conteúdo das narinas e da cavidade oral foi realizada com o auxílio de uma bomba de vácuo. Simultaneamente, o animal foi lavado com água fria, como forma de estimular seu sistema respiratório. Ao final deste processo (2 a 3 min) o animal foi colocado em decúbito lateral, sendo submetido à oxigenioterapia constante (5 L/min) e nova avaliação clínica. O aquecimento do animal foi realizado com o auxílio de um secador de cabelo e lâmpada infravermelha, o qual foi prática constante durante todo o período.

A avaliação do estado clínico foi realizada constantemente e os parâmetros de frequência cardíaca, respiratória e temperatura foram verificados a cada 20 ou 30 min.

Foi administrado por via intra-traqueal 400 mg de surfactante 5 min após o nascimento. Nos primeiros 90 min de vida o animal recebeu mais duas doses de 400 mg cada. Ao todo, o animal recebeu 2,6 g de surfactante.

O monitoramento da hemogasometria arterial foi realizado periodicamente e para isto foi puncionada artéria femoral; para a hemogasometria venosa, puncionou-se a veia jugular externa (ver gráficos).

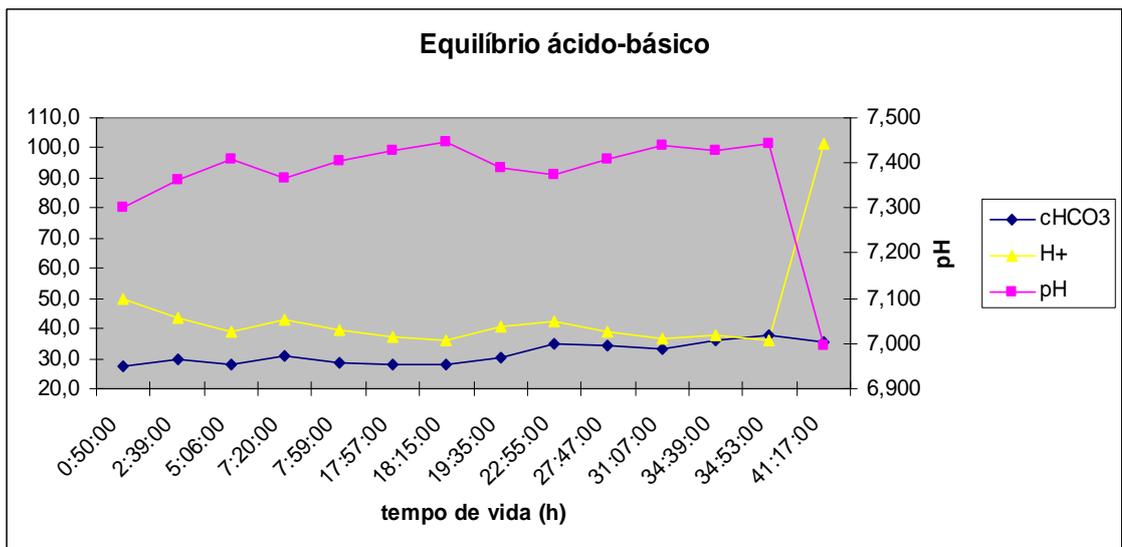
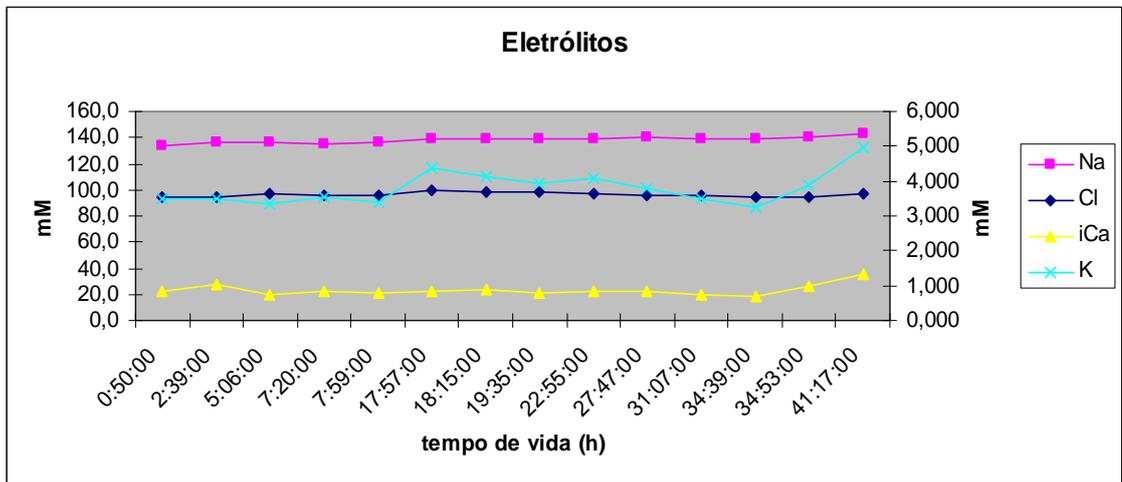
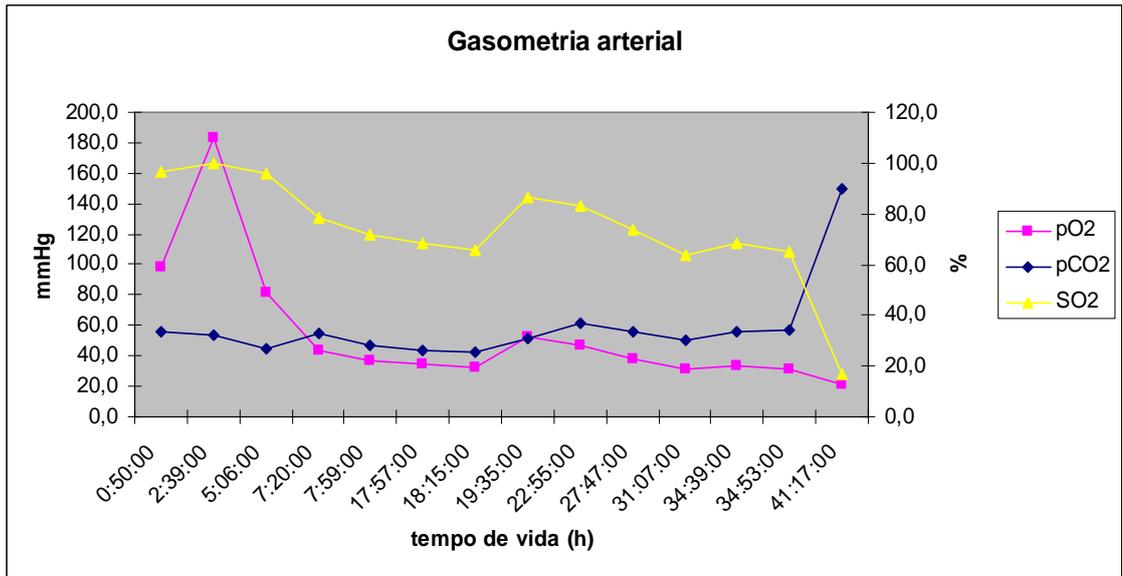
Nas primeiras 6 h de vida, observou-se excelente prognóstico e evolução dentro da normalidade. Duas horas após o nascimento, o animal ficou em estação com dificuldade em equilibrar-se, mas com força suficiente para manter-se sozinho. Apresentou reflexo de sucção com 40 min e mamou colostro na mamadeira com duas horas de vida.

Entre 6 e 15 h de vida, o animal manteve-se estável, entretanto, apresentou pO_2 um pouco abaixo do esperado (40 mmHg), ainda que tenha sido administrado surfactante e oxigenioterapia contínua. O animal mostrava-se ativo, levantando-se e mamando espontaneamente. Entre 15 e 18 h de vida, o animal foi retirado da sala de tratamento intensivo e o oxigênio foi removido, sendo transferido para uma área coberta e aberta ao lado da baia da receptora, onde pôde movimentar-se livremente. O animal continuava a mostrar-se bastante ativo e mamou espontaneamente na receptora por alguns instantes. Com 18 h de vida, houve queda no hematócrito e concomitante diminuição da temperatura retal, e o animal foi novamente transferido para a sala de tratamento intensivo e submetido à oxigenioterapia. Entre 18 e 23 h, ao retornar à sala de tratamento intensivo, o animal apresentava ruídos pulmonares mais intensos e respirava com mais dificuldade. Foi novamente submetido à oxigenioterapia e nova dose de surfactante foi administrada. Foi também administrado aminofilina, o que diminuiu significativamente os ruídos respiratórios. Com este tratamento, em um período de 1 h e 20 min, a pO_2 arterial aumentou de 32 mmHg para 52 mmHg, e se manteve ao redor de 50 mmHg até as 23 h de vida. Entretanto, apresentou hipoalbuminemia que se agravou nas horas seguintes. Entre 23 e 31 h, apesar da administração de oxigênio, aminofilina e surfactante, a pO_2 arterial ficou abaixo de 40 mmHg. O animal mamava com dificuldade e a hipoalbuminemia se agravou. Entre 31 e 39 h o quadro respiratório piorou sensivelmente, apesar da manutenção do tratamento (aminofilina, surfactante e oxigênio). A ausculta pulmonar associada à hipoalbuminemia sugeriu um quadro de edema pulmonar associado à hipóxia. A partir deste momento, iniciou-se o tratamento com dexametasona, diurético e administração de albumina humana por via endovenosa. O animal não apresentou melhora do estado geral, nem de elevação da pO_2 , entretanto, se manteve tranqüilo, quando em repouso. Houve aumento da albumina sérica às 39 h. No período entre 39 a 42 h, o animal foi colocado em estação para que pudesse mamar na mamadeira, porém, quando foi submetido a este esforço, o quadro respiratório agravou. O tratamento com diurético, aminofilina, aumento do fluxo de oxigênio e dexametasona não impediu que o animal

atingisse um grau de descompensação respiratória incompatível com a vida. Com 41 h, a pO_2 arterial atingiu 21,6 mmHg e pH sanguíneo 6,99, desencadeando o processo de morte.

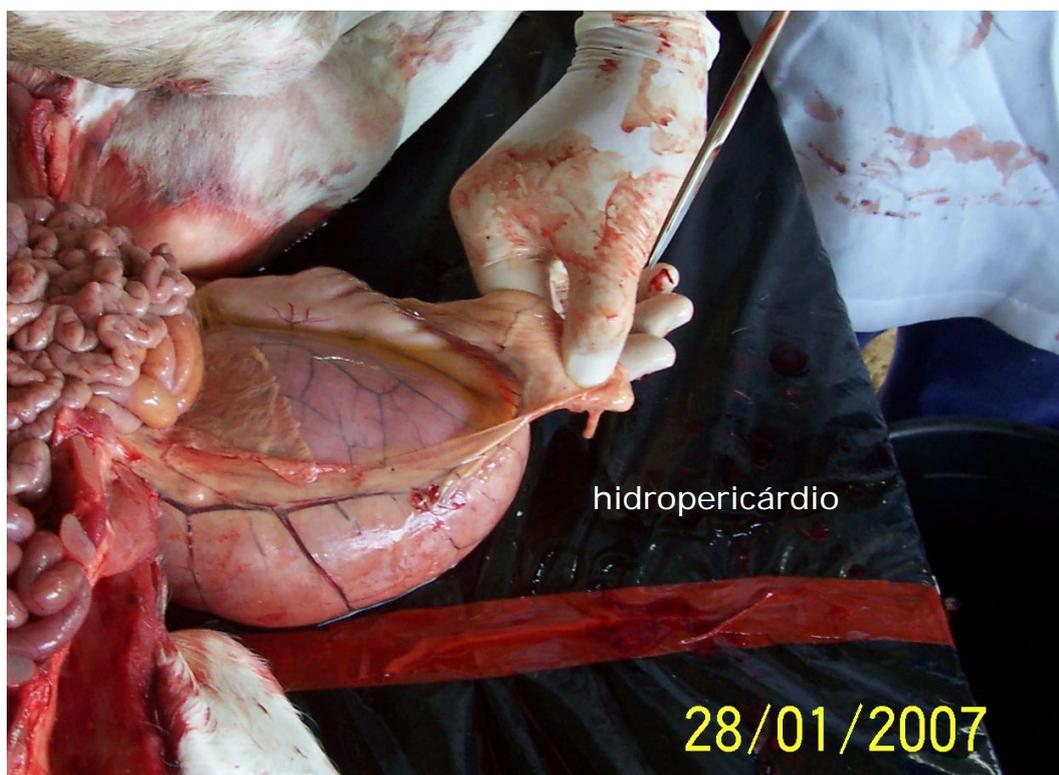
Monitoramento da oxigenioterapia e administração de surfactante e aminofilina.

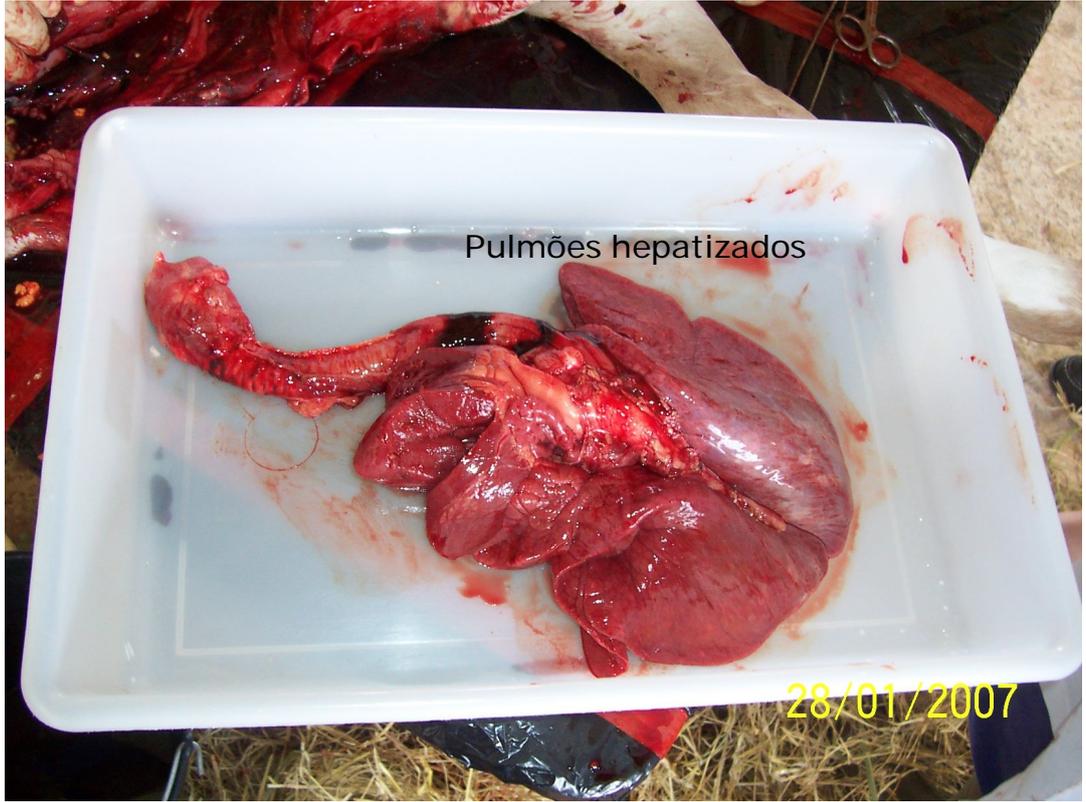
oxigenioterapia		surfactante		aminofilina	
tempo de vida (h:min)	O ₂ (L/min)	tempo de vida (h:min)	dose (mg)	tempo de vida (h:min)	dose (mg)
0:10	5	0:15	400	18:40	240
2:20	3	0:40	400	23:10	240
8:10	5	1:35	400	31:30	120
15:10	0	8:10	400	32:48	120
18:10	7	18:10	400	35:10	240
24:00	5	20:10	400	40:35	240
40:35	7	23:20	200		
		34:10	500		



APÊNDICE M – Achados macroscópicos na necropsia do clone

Na necropsia do animal, os pulmões apresentavam aspecto hepatizado e havia líquido na cavidade cardíaca (hidropericárdio). Constatou-se a presença de ducto arterioso persistente e forame oval aberto. O animal também apresentava úraco persistente. Os rins não apresentaram alteração, bem como o abomaso estava íntegro. O fígado apresentava bordos arredondados, coloração ocre, não homogêneo, congestão leve, não friável ao corte. Alguns canalículos biliares estavam hipertrofiados. Havia áreas de fibrose na cápsula. A partir das lesões macroscópicas evidenciadas no momento da necropsia a causa *mortis* preliminar foi determinada como insuficiência respiratória.





Pulmões hepatizados

28/01/2007



Pulmões hepatizados

28/01/2007



ANEXO A – Laudo da análise de DNA microsatélite



GENE/GENEALÓGICA CGTA LTDA

Rua Prof. Magalhães Penido, 697 sala 705
31270-700 - Belo Horizonte - MG
(31) 3441-3373
genegenealogica@genealogica.com.br

GRUPO: HOL00010

TESTE DE IDENTIDADE GENÉTICA

As amostras identificadas como ÚRSULA, CLONE 1 e CLONE 2 e testadas respectivamente como HOL00010-01, 02 e 03, apresentam os mesmos alelos nos 12 locos analisados mostrando completa identidade genética.

A amostra identificada como RECEPTORA e testada com HOL00010-04 apresenta alelos diferentes em em 9 dos 12 locos analisados.

Belo Horizonte, 31 de maio de 2005

Dr. Sérgio Danilo Junho Pena
PHD, CRM-MG 14.894

ANEXO B – Análise de DNA microssatélite do feto 1



GENE/GENEALÓGICA CGTA LTDA
ISAG code: BR/BH

Rua Prof. Magalhães Penido 697 sala 705
 31270-700 - Belo Horizonte - MG
 (31) 3441-3373
 genegenealogica@genealogica.com.br

CERTIFICADO DE GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITES
ANÁLISE DE DNA

Proprietário: LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA E BIOT DE REPROD/FAVET

Propriedade/Empresa: JOSE LUIZ RODRIGUES

Responsável pela Coleta:

Registro Profissional:

Data Coleta: 12/05/2005

Grupo: HOL00010-02

Nome do Animal: CLONE 1

Nº Registro:

Data Nasc.:

Espécie: BOVINA

Raça: HOLANDESA

Sexo: FEMININO

O perfil alélico abaixo foi determinado por escada alélica padronizada pelos resultados do teste comparativo do ISAG 2003/2004

BM1824	BM2113	SPS115	TGLA227	INRA23	TGLA122
178 180	139 139	248 256	91 97	214 214	143 153
TGLA126	BM1818	ETH10	ETH225	TGLA57	
117 117	260 264	217 219	148 152	102 102	X X

Belo Horizonte, 20/06/2005

Responsável Técnico: Dr. Sérgio Danilo Junho Pena
 PHD, CRM- MG 14.894

ANEXO C – Análise de DNA microssatélite do feto 2



GENE/GENEALÓGICA CGTA LTDA
ISAG code: BR/BH

Rua Prof. Magalhães Penido 697 sala 705
 31270-700 - Belo Horizonte - MG
 (31) 3441-3373
 genegenealogica@genealogica.com.br

CERTIFICADO DE GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITES
ANÁLISE DE DNA

Proprietário: LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA E BIOT DE REPROD/FAVET

Propriedade/Empresa: JOSE LUIZ RODRIGUES

Responsável pela Coleta:

Registro Profissional:

Data Coleta: 12/05/2005

Grupo: HOL00010-03

Nome do Animal: CLONE 2

Nº Registro:

Data Nasc.:

Espécie: BOVINA

Raça: HOLANDESA

Sexo: FEMININO

O perfil alélico abaixo foi determinado por escada alélica padronizada pelos resultados do teste comparativo do ISAG 2003/2004

BM1824	BM2113	SPS115	TGLA227	INRA23	TGLA122
178 180	139 139	248 256	91 97	214 214	143 153
TGLA126	BM1818	ETH10	ETH225	TGLA57	
117 117	260 264	217 219	148 152	102 102	X X

Belo Horizonte, 20/06/2005

Responsável Técnico: Dr. Sérgio Danilo Junho Pena
 PHD, CRM- MG 14.894

ANEXO D – Análise de DNA microssatélite da doadora

**GENE/GENEALÓGICA CGTA LTDA****ISAG code: BR/BH**

Rua Prof. Magalhães Penido 697 sala 705

31270-700 - Belo Horizonte - MG

(31) 3441-3373

genegenealogica@genealogica.com.br

**CERTIFICADO DE GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITES
ANÁLISE DE DNA**

Proprietário: LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA E BIOT DE REPROD/FAVET**Propriedade/Empresa:** JOSE LUIZ RODRIGUES**Responsável pela Coleta:****Registro Profissional:****Data Coleta:** 12/05/2005

Grupo: HOL00010-01	
Nome do Animal: URSULA	
Nº Registro:	Data Nasc.:
Espécie: BOVINA	Raça: HOLANDESA
	Sexo: FEMININO

O perfil alélico abaixo foi determinado por escada alélica padronizada pelos resultados do teste comparativo do ISAG 2003/2004

BM1824	BM2113	SPS115	TGLA227	INRA23	TGLA122
178 180	139 139	248 256	91 97	214 214	143 153
TGLA126	BM1818	ETH10	ETH225	TGLA57	
117 117	260 264	217 219	148 152	102 102	X X

Belo Horizonte, 20/06/2005

Responsável Técnico: Dr. Sérgio Danilo Junho Pena
PHD, CRM- MG 14.894

ANEXO E – Análise de DNA microssatélite da receptora

**GENE/GENEALÓGICA CGTA LTDA****ISAG code: BR/BH**

Rua Prof. Magalhães Penido 697 sala 705

31270-700 - Belo Horizonte - MG

(31) 3441-3373

genegenealogica@genealogica.com.br

**CERTIFICADO DE GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITES
ANÁLISE DE DNA**

Proprietário: LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA E BIOT DE REPROD/FAVET**Propriedade/Empresa:** JOSE LUIZ RODRIGUES**Responsável pela Coleta:****Registro Profissional:****Data Coleta:** 12/05/2005

Grupo: SRD00004	
Nome do Animal: RECEPTORA	
Nº Registro:	Data Nasc.:
Espécie: BOVINA	Raça: SEM RACA
	Sexo: FEMININO

O perfil alélico abaixo foi determinado por escada alélica padronizada pelos resultados do teste comparativo do ISAG 2003/2004

BM1824	BM2113	SPS115	TGLA227	INRA23	TGLA122
180 180	139 139	252 254	81 87	206 214	143 151
TGLA126	BM1818	ETH10	ETH225	TGLA57	
115 123	264 266	217 219	146 150	98 98	X X

Belo Horizonte, 20/06/2005

Responsável Técnico: Dr. Sérgio Danilo Junho Pena
PHD, CRM- MG 14.894

ANEXO F – Laudo de necropsia do feto 1



Faculdade Veterinária

Depto de Patologia Clínica Veterinária

Setor de Patologia Veterinária

(Tel.051 33166107 Fax. 33166116)

e-mail: setpatvet@ufrgs.com.br



Resultado de Exames

Laudo: 31/05/05

Técnico requisitante:
Arnaldo Diniz Vieira

Proprietário:
Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues.
Laboratório de Embriologia e Biotecnologia

Técnico responsável:
Dr. Luis Gustavo Corbellini
Caroline A. Pescador, MSc

Registro número: A261/05
Data de recebimento: 03/05/05
Data da necropsia: 03/05/05

Material enviado: feto bovino abortado.

Avaliação Macroscópica: feto bovino abortado, fêmea, HPB, medindo aproximadamente 72cm de comprimento equivalendo a 8 meses de idade gestacional. Feto em bom estado nutricional, apresentando externamente liberação de mecônio pelo orifício anal. Durante a abertura das cavidades foi constatado atelectasia pulmonar e congestão do córtex cerebral. Demais órgãos sem alterações.

Exame histopatológico:

Pulmão: presença de mecônio e queratina no interior dos alvéolos.

Cérebro: congestão multifocal
Demais órgãos sem alterações.

Exame imunoistoquímico:

BVDV: negativo.

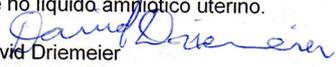
Exame bacteriológico: cultivo aeróbio de amostras de fígado e pulmão não revelou crescimento bacteriano significativo.

Brucella spp: negativo.

Exame de Imunofluorescência Direta para detecção de *Leptospira* spp.: negativo

Diagnóstico provável: inconclusivo.

Comentários: diversas são as causas que podem ocasionar aborto em bovinos. A ausência de lesões inflamatórias nos órgãos analisados indica que possivelmente o aborto não tenha sido de origem infecciosa. A presença de mecônio no interior dos alvéolos indica hipóxia fetal com aspiração de mecônio presente no líquido amniótico uterino.


David Driemeier
CRMV/RS 5756

ANEXO G – Laudo de necropsia do feto 2



Faculdade Veterinária

Depto de Patologia Clínica Veterinária

Setor de Patologia Veterinária

(Tel.051 33166107 Fax. 33166116)

e-mail: setpatvet@ufrgs.com.br



Resultado de Exames

Laudo: 31/05/05

Técnico requisitante:
Arnaldo Diniz Vieira

Proprietário:

Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues.
Laboratório de Embriologia e Biotecnologia

Técnico responsável:
Dr. Luís Gustavo Corbellini
Caroline A. Pescador, MSc

Registro número: A262/05
Data de recebimento: 03/05/05
Data da necropsia: 03/05/05

Material enviado: feto bovino abortado.

Avaliação Macroscópica: feto bovino abortado, fêmea, HPB, medindo aproximadamente 79cm de comprimento equivalendo a 8 meses de idade gestacional. Feto em bom estado nutricional, apresentando externamente liberação de mecônio pelo orifício anal. Durante a abertura das cavidades foi constatado atelectasia pulmonar e congestão do córtex cerebral. Demais órgãos sem alterações.

Exame histopatológico:

Pulmão: presença de mecônio e queratina no interior dos alvéolos.

Cérebro: congestão multifocal
Demais órgãos sem alterações.

Exame imunoistoquímico:

BVDV: negativo.

Exame bacteriológico: cultivo aeróbio de amostras de fígado e pulmão não revelou crescimento bacteriano significativo.

Brucella spp: negativo.

Exame de Imunofluorescência Direta para detecção de *Leptospira* spp.: negativo

Diagnóstico provável: inconclusivo.

Comentários: diversas são as causas que podem ocasionar aborto em bovinos. A ausência de lesões inflamatórias nos órgãos analisados indica que possivelmente o aborto não tenha sido de origem infecciosa. A presença de mecônio no interior dos alvéolos indica hipóxia fetal com aspiração de mecônio presente no líquido amniótico uterino.

David Driemeier
CRMV/RS 5756

ANEXO H – Análise do DNA mitocondrial dos fetos abortados
Análise Realizada no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento
USP-Pirassununga/SP

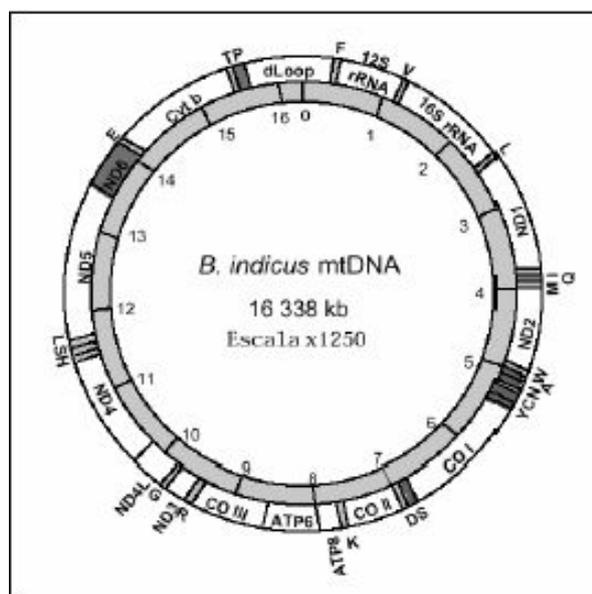
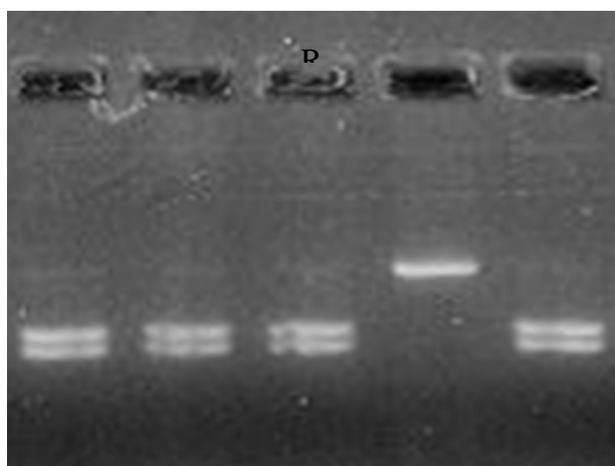
Extração de DNA

Para a realização do estudo, o DNA foi extraído a partir de sangue coletado da receptora e doadora e de um fragmento de tecido de ambos os clones. Resumidamente, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise contendo 12 mM de Tris-HCl, pH 8,2; 0,32 M de Sacarose; 5 mM de EDTA e 1% de Triton 100X. Os glóbulos brancos peletizados e o tecido foram digeridos com proteinase K (0,5 mg/mL) por 3 h a 55 °C. As proteínas foram então precipitadas com solução de NaCl 5 M e o sobrenadante recuperado. Em seguida, o DNA foi precipitado, adicionando-se 3 vezes o volume de etanol absoluto, desidratado e rediluído em água ultrapura (Sambrook e Russel, 2001).

DNA Mitocondrial (mtDNA)

A amplificação do DNA mitocondrial foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores direto 5'CCCAACGAGGAAAATATACC 3' e reverso 5'AACCGCAAACAACCTCTTCC 3', sintetizados para amplificar uma região do gene ND5 do genoma mitocondrial entre os nucleotídeos 11770 e 12525 de acordo com Anderson et al. (1982; Figura 1). Finalizando um volume de 50 µL, a reação de PCR foi composta de 100 ng de DNA, solução tampão 1X (estoque 10X: 200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), 200 µM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O DNA foi amplificado por 35 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos à 58°C e 45 segundos a 72°C e então digerido com a enzima de restrição *Hind* III (Invitrogen), submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X e corado com brometo de etídeo. O mtDNA foi analisado e, de acordo com a presença ou ausência do sítio de restrição da enzima *Hind* III, os indivíduos foram classificados como portadores de mtDNA *Bos indicus* ou *Bos taurus*.

ANEXO H (cont.)

Figura 1. Esquema mtDNA *Bos indicus***Resultado mtDNA**

CI = Controle *Bos indicus*; CT = Controle *Bos taurus*

Amostra	Resultado mtDNA
Feto 1	<i>Bos taurus</i>
Feto 2	<i>Bos taurus</i>
Receptora	<i>Bos taurus</i>

ANEXO H (cont)

```

          510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1_MtDNA_F ATTATTTCAAAGTACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAATTATCCCTCAGCTTTAAAAATAGACTATTTCTCAATAATATTATCCAGTAGCACTAT
1_MtDNA_R ATTATTTCAAAGTACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAATTATCCCTCAGCTTTAAAAATAGACTATTTCTCAATAATATTATCCAGTAGCACTAT
2_MtDNA_F ATTATTTCAAAGTACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAATTATCCCTCAGCTTTAAAAATAGACTATTTCTCAATAATATTATCCAGTAGCACTAT
2_MtDNA_R ATTATTTCAAAGTACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAATTATCCCTCAGCTTTAAAAATAGACTATTTCTCAATAATATTATCCAGTAGCACTAT
3_MtDNA_R ATTATTTCAAAGTACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAATTATCCCTCAGCTTTAAAAATAGACTATTTCTCAATAATATTATCCAGTAGCACTAT
3_MtDNA_F ATTATTTCAAAGTACACTGACTAACCATCCAAACTCTTAAATTATCCCTCAGCTTTAAAAATAGACTATTTCTCAATAATATTATCCAGTAGCACTAT

          610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
1_MtDNA_F TCGTCACATGATCTATTATAGAATTCTCAATATGATATATATACTCAGACCCCAATATTAACAAATTCCTCAAAATCTGCTCCTATTCCCTCAT-ACTGT
1_MtDNA_R TCGTCACATGATCTATTATAGAATTCTCAATATGATATATATACTCAGACCCCAATATTAACAAATTCCTCAAAATCTGCTCCTATTCCCTCATTACTAT
2_MtDNA_F TCGTCACATGATCTATTATAGAATTCTCAATATGATATATATACTCAGACCCCAATATTAACAAATTCCTCAAAATCTGCTCCTATTCCCTCATTACTAT
2_MtDNA_R TCGTCACATGATCTATTATAGAATTCTCAATATGATATATATACTCAGACCCCAATATTAACAAATTCCTCAAAATCTGCTCCTATTCCCTCATTACTAT
3_MtDNA_R TCGTCACATGATCTATTATAGAATTCTCAATATGATATATATACTCAGACCCCAATATTAACAAATTCCTCAAAATCTGCTCCTATTCCCTCATTACTAT
3_MtDNA_F TCGTCACATGATCTATTATAGAATTCTCAATATGATATATATACTCAGACCCCAATATTAACAAATTCCTCAAAATCTGCTCCTATTCCCTCAT-AC-AN

          710      720
...|...|...|...|...|...
1_MtDNA_F CACCTG
1_MtDNA_R GCCATCCTGACNANAAAAAAAAA
2_MtDNA_F GCTCTG
2_MtDNA_R GTCATCTGAACGNAAAAAAAAA
3_MtDNA_R GTCATCTGA-CNAAAAAAAAA
3_MtDNA_F GCACTG

```

ANEXO I – Laudo histopatológico do clone nascido



Faculdade Veterinária
 Departamento de Patologia Clínica Veterinária
 Setor de Patologia Veterinária
 Telefone: 51 3316-6107
 Fax. 3316-6116
 E-mail: setpatvet@ufrgs.br



Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 05 de fevereiro de 2007.

AP-0238-07

Ficha: Não informado (NI)
Espécie: Bovino
Raça: Nelore
Sexo: Fêmea
Idade: 2 dias
Nome: NI
Proprietário: NI
Telefone: NI

Endereço: NI
Veterinário: Prof. Rodrigues UFRGS
E-mail:
Telefone: Ramal 6126
Plantonista: Pedro Bezerra
Data do recebimento: 30/01/2007
Material enviado: Pulmão, fígado, ovário, linfonodo, baço, intestino, pâncreas e rim

Histórico: Produto de embrião clonado.

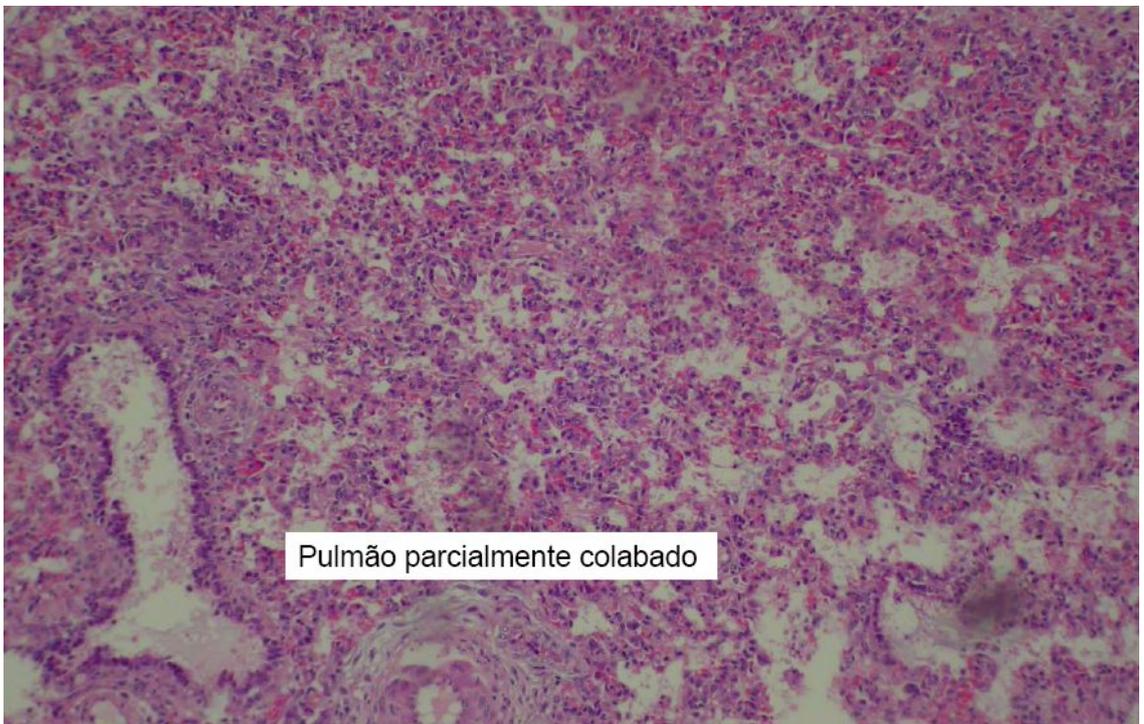
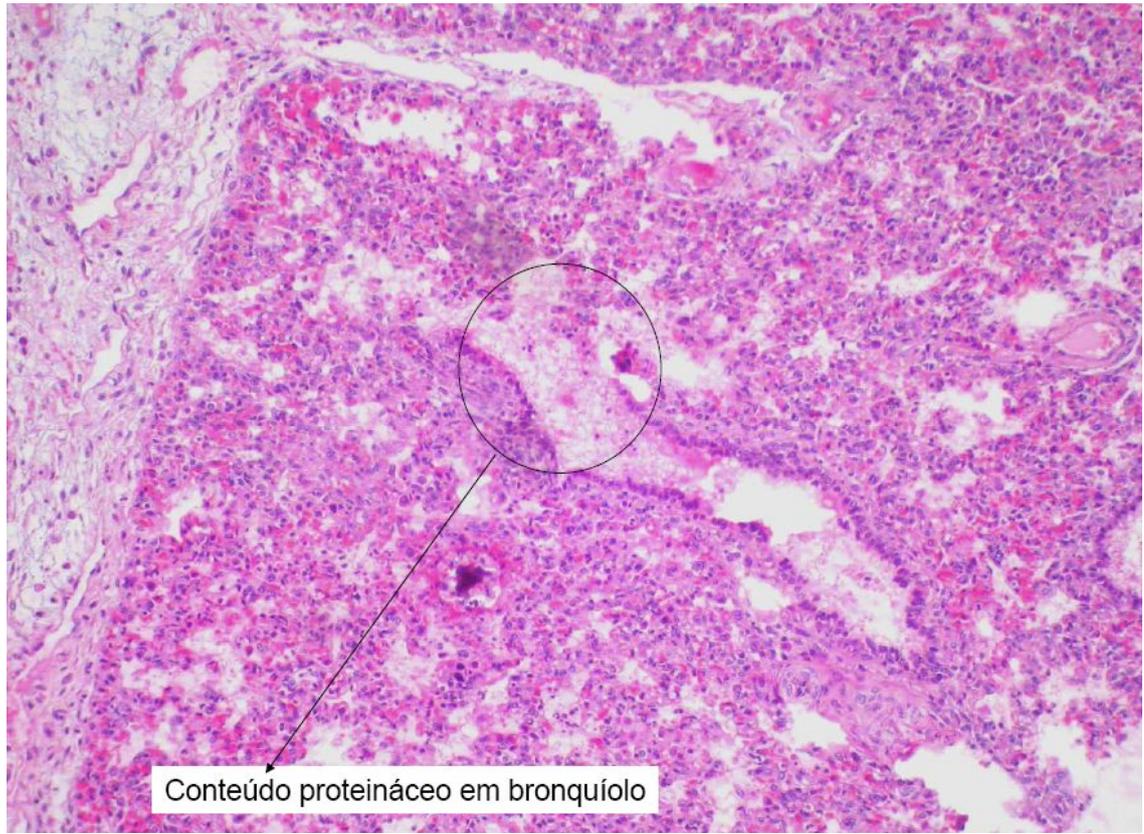
Descrição histológica: **Pulmão**: alvéolos parcialmente colabados, espessamento de septos alveolares, congestão, gotículas proteináceas e macrófagos no lúmen dos alvéolos, brônquios e bronquíolos. **Fígado**: vacuolização de hepatócitos centrolobular moderada. **Ovário**: hemorragia focal moderada. **Linfonodo**: congestão. **Baço, intestino, pâncreas e rim** sem alterações significativas.

Diagnóstico: **Pulmão**: atelectasia e aspiração de material proteináceo sugestivo de aspiração de leite.

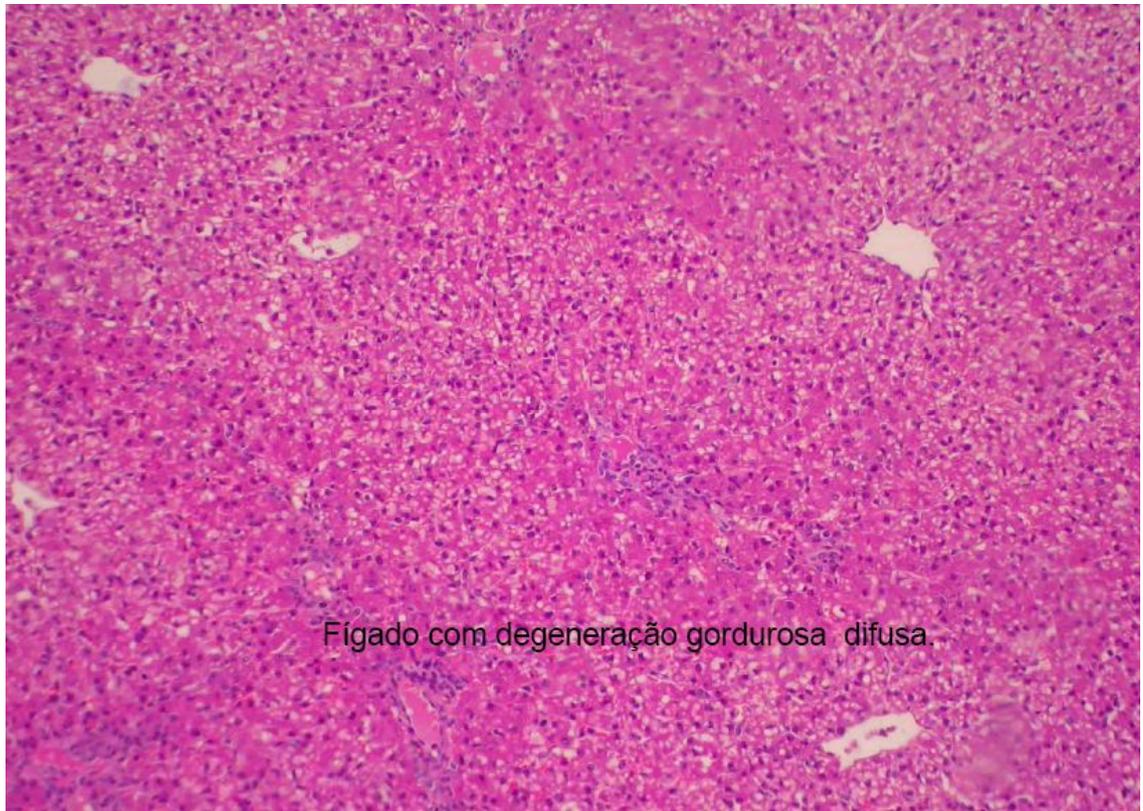
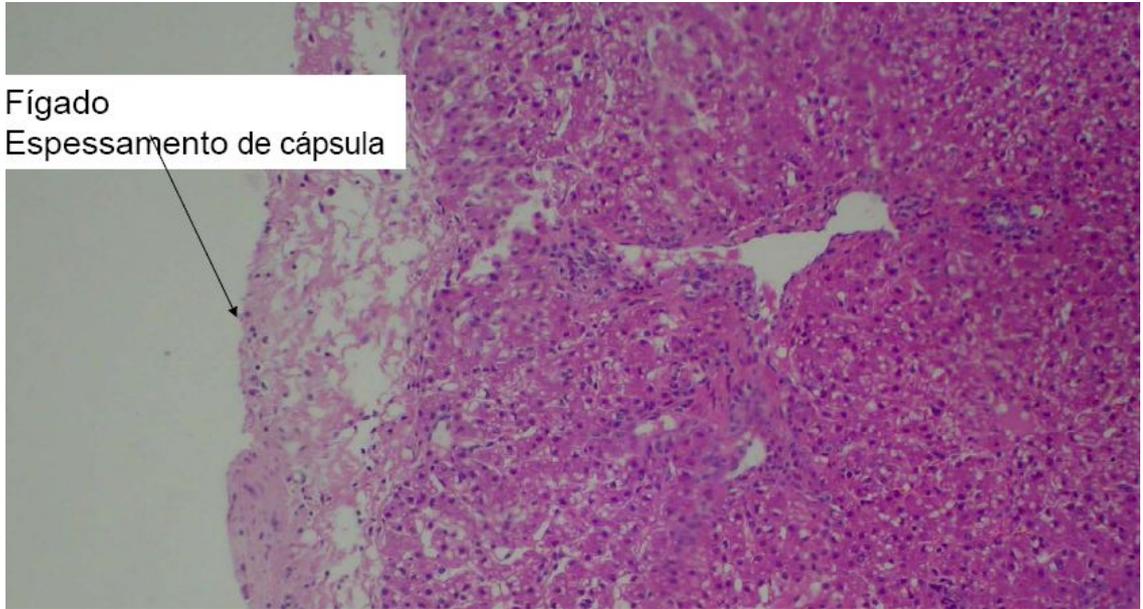
Prof. David Driemeier.

CRMV-RS 5756

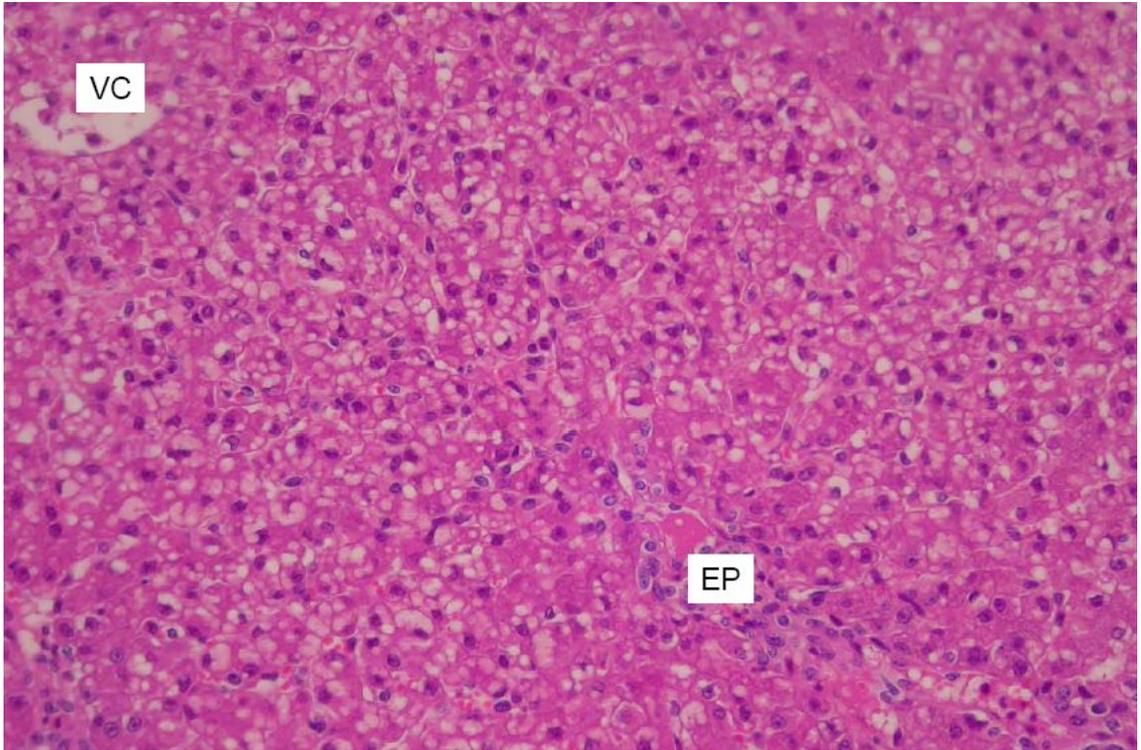
ANEXO J – Fotos da histopatologia do clone nascido



ANEXO J (cont.)



ANEXO J (cont.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CLONES POR
TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM A UTILIZAÇÃO DE OÓCITOS
VITRIFICADOS E DIFERENTES TIPOS CELULARES COMO DOADORES DE
NÚCLEO

FABIANA FORELL

PORTO ALEGRE

2008

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)