

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MARYNA DA COSTA BARBOSA

Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Brasília, DF

Dezembro de 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MARYNA DA COSTA BARBOSA

Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

Brasília, DF
Dezembro de 2014

Ficha Catalográfica

Barbosa, Maryna da Costa.

Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias - Maryna da Costa Barbosa; orientação de Ivo Pivato.- Brasília, 2014

42 p.:il.

Monografia- Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. Bezerro 2. Clone 3. Embrião 4. Macrossomia 5. Hidroalantóide 6. Hipóxia

I. BARBOSA, M.C. II. Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias.

Nome do Autor: Maryna da Costa Barbosa

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias.

Ano: 2014

É Concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Maryna da Costa Barbosa

e-mail: marynna16@hotmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO:**Nome do Autor:** Barbosa, Maryna da Costa.**Título:** Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 09/11/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Julgamento: APROVADO

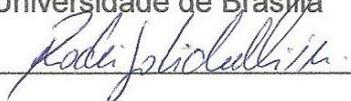
Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

Prof. Rodrigo Vidal de Oliveira

Julgamento: APROVADO

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

Dr. Carlos Frederico Martins

Julgamento: APROVADO

Instituição: Embrapa

Assinatura: 

Agradecimentos

A Deus, por ter sido fiel comigo em todos os momentos, por renovar a cada instante as minhas forças e disposição e não ter me deixado fazer essa caminhada sozinha.

Aos meus pais, Zebinha e Dôra, meus maiores exemplos. Obrigada pelas orações em meu favor. Obrigada por serem a minha referência e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável, mesmo separados por tantos quilômetros. Obrigada por todo carinho, dedicação, amor e por ter me proporcionado a chance de estar onde estou hoje. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Marylia e André, ao meu cunhado Renato, a minha prima Carol e a tia Cida que me acompanharam durante toda essa caminhada. Obrigada por todo carinho sempre demonstrado.

A todos os professores do curso, em especial ao meu orientador Ivo Pivato, pelo carinho, paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desse curso e ao professor Rodrigo Arruda. Vocês foram mais do que professores. Obrigada por me contagiar, em cada aula ministrada, com o amor de vocês pela profissão de médicos veterinários. Vocês são demais!

Às pessoas essenciais e que fizeram essa caminhada se tornar mais leve. O que teria sido de mim, durante todo esse período da graduação, sem todas as ligações recebidas, palavras de incentivo e consolo, caronas (que foram muitas), mensagens, cartinhas, almoços, convites para festas mesmo sabendo que eu não iria. A vocês, Cristiano Bouéres, André Leonardo, Yonara Garcia, Bruno Holanda, Susy Hermes, Beatrice Barbosa, Veronica Takatisuka, Juliane Gracino, Karina Azevedo e demais colegas, meus sinceros agradecimentos. Vou sentir imensas saudades de todos os momentos que passamos juntos. Desejo para vocês o melhor caminho sempre e espero nunca perder o contato.

As minhas amigas baianas, Ana Clara, Larissa e ao amigo Bal, pois mesmo distantes estavam presentes em minha vida. Foi com vocês que compartilhei angústias, alegrias, felicidades e tantas outras coisas.

À Embrapa CENARGEN, CTZL e Fazenda Sucupira por terem aberto as portas para a realização do meu estágio, sendo tão bem acolhida por todos.

Aos funcionários do CTZI, em especial ao Cléber Pio, Zetinha, Dona Marlene, Wagner, Indiara, Carlão e Geraldo pelos ensinamentos, carinho, cuidado e preocupação durante todo o período do meu estágio. Muito obrigada!

Por fim, não poderia deixar de agradecer aos animais, os seres mais importantes de toda minha caminhada, pois sem eles, realizar esse sonho seria impossível. Agradeço em especial as minhas “filhas”, Nina (minha flor de lis) e a Tuca, por cada latido de alegria quando eu chegava de viagem, por cada roupa manchada com suas patinhas e principalmente pelo amor incondicional. Obrigada a todos os animais por me ensinar um pouco mais da vida e por serem o maior e o melhor motivo que me fez chegar onde cheguei.

Epígrafe

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”
Albert Einstein.

RESUMO

BARBOSA, M. C. Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias/ Cloning in cattle: description of the main anomalies. 2014. 42 p. Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, DF.

A produção de animais clonados utilizando núcleos de células somáticas ocorreu após inúmeras décadas de pesquisas. Atualmente o processo tornou-se relativamente fácil, porém animais clonados apresentam uma grande variedade de malformações fetais e placentárias. Segundo estudos realizados ao longo dos anos, são várias as anormalidades apresentadas pelos clones bovinos, como: hidroalantóide, hipóxia, macrossomia, anemia, distúrbios cardiorrespiratórios, alopecia, aumento da espessura do cordão umbilical e persistência do canal do úraco, hipertermia, problemas posturais e musculoesqueléticos. Uma possível causa dessas malformações são falhas na reprogramação epigenética da célula doadora.

Palavras-chave: bezerro, clone, embrião, hidroalantóide, hipóxia, macrossomia.

ABSTRACT

BARBOSA, M. C. Cloning in cattle: description of the main anomalies./ Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias. 2014. 42 p. Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, DF.

The production of cloned animals using somatic cell nuclei occurred after several decades of research, currently the process has become relatively easy but cloned animals show a variety of fetal and placental defects, according to studies conducted over the years, placentation disorders in animals has a direct relation with the abnormalities displayed by the clones as hydrallantois, hypoxia, macrosomia, anemia, cardiopulmonary disorders, alopecia, increased thickness of the umbilical cord and persistent urachus, hyperthermia, postural and musculoskeletal problems. One possible cause of these malformations are flaws in epigenetic reprogramming of the donor cell.

Keywords: calf, clone, embryo, hydrallantois, hypoxia, macrosomia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. HISTÓRICO DA CLONAGEM	14
2.2 ANORMALIDADES EM CLONES BOVINOS	16
2.2.1 Placentação	16
2.2.2 Hidroalantóide	19
2.2.3 Hipóxia/Sufrimento fetal.....	20
2.2.4 Macrossomia	21
2.2.5 Anemia	22
2.2.6 Distúrbios cardiorrespiratórios.....	22
2.2.7 Envelhecimento Precoce.....	24
2.2.8 Outras anomalias.....	25
2.2.9 Principais causas das anomalias	28
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS:	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	37
5.1. INTRODUÇÃO	37
5.2. IDENTIFICAÇÃO DA PRIMEIRA ETAPA DO ESTÁGIO	38
5.2.1 PLANO DE TRABALHO	38
5.3 IDENTIFICAÇÃO DA SEGUNDA ETAPA DO ESTÁGIO	38
5.3.1 PLANO DE TRABALHO	38
5.4. Atividades desenvolvidas	39
5.4.1. Inovulação de embrião produzidos por PIV	39
5.4.2. Palpação retal	40
5.4.3. Ultrassonografia.....	41
5.4.4. Journal Club	41
5.4.5.Outros	41
5.5. Considerações finais sobre o estágio	42

Lista de Figuras

Figura 1: Porã, clone bovino da raça Junqueira.....	16
Figura 2: Placentomas Gigantes.....	17
Figura 3: Microcotilédones Acessórios.....	17
Figura 4: A-D placenta de clones, E-H placenta de animais produzidos in vivo.....	18
Figura 5: Clone tingido de mecônio – sinal de hipóxia durante a vida intrauterina.....	20
Figura 6: Cistos hemáticos em valvas atrioventriculares.....	24
Figura 7 : Alopecia.....	25
Figura 8: Aumento da espessura do cordão umbilical.....	26
Figura 9: Fígado retirado de animal clonado, com bordos arredondados e de gordura na superfície.....	26
Figura 10: Aumento das dimensões das articulações metacarpofalangeana e metatarsofalangeana.....	27
Figura 11: Animal clonado apresentando flexão das articulações metatarsofalangeanas.....	27
Figura 12: Hidrotórax seroso.....	28

Lista de Abreviaturas e Siglas

cm - Centímetros

CTZL- Centro de Transferência de Tecnologias em Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IATF - Inseminação artificial em tempo fixo

IGF-2 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-2

IGF2R - Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-2

LOS - "*Large Offspring Syndrome*"

OPU - "Ovum pick-up" - Aspiração Folicular

PIV - Produção *in vitro*

TE - Transferência de embrião

TETF - Transferência de embrião em tempo fixo

TN - Transferência Nuclear

TNCS - Transferência Nuclear de Células Somáticas

1. INTRODUÇÃO

A clonagem animal tem progredido a cada ano e é um dos maiores avanços obtidos no campo da biotecnologia animal. Isso se deve basicamente às descobertas que vêm ocorrendo na área da tecnologia de transferência nuclear (TN). A mesma consiste na transferência do núcleo de uma célula do animal a ser clonado para um citoplasma receptor, que é um ovócito enucleado, permitindo assim a produção de animais transgênicos, a preservação do material genético de diversas espécies ameaçadas de extinção e também a produção de animais geneticamente idênticos.

A eficácia da técnica ainda é pequena mesmo apresentando inúmeras vantagens. Isso fica evidenciado na baixa viabilidade dos embriões clonados e o baixo número de nascimentos de bezerros vivos e saudáveis em comparação aos produzidos *in vitro* (MIGLINO, 2004), sendo necessário, portanto, muito trabalho e estudo para um melhor entendimento das funções nucleares, citoplasmáticas e um melhor aperfeiçoamento das etapas da técnica (SILVA, 2013).

Apesar do médico veterinário ter um cuidado maior que o habitual, poucas gestações de clones têm conseguido ser levadas até o fim, ocorrendo muitas perdas embrionárias, fetais e até mesmo pós-natais. A grande perda de gestações em bovinos clonados pode ser decorrente das anomalias placentárias que afetam tanto o crescimento, como a viabilidade dos animais (GUIMARÃES et al., 2012).

Os problemas perinatais têm sido associados com diferentes anomalias, incluindo disfunções respiratórias, defeitos cardíacos e circulatórios, deficiências imunológicas, congestão e fibrose hepática, problemas renais, ascite, problemas articulares, disfunções sistêmicas, entre outros (BORDIGNON, 2008). O excesso de peso ao nascimento ou *large offspring syndrome* (LOS) é outro problema observado frequentemente em animais clonados (YOUNG et al., 1998).

Objetivou-se com o presente fazer uma breve revisão de literatura sobre algumas anomalias que ocorrem em bovinos clonados, durante o período gestacional e ao nascimento, abordando desde o histórico da clonagem até as principais anomalias e suas causas. Serão abordadas as seguintes anomalias: anomalias na placentação, hidroalantóide, hipóxia, macrossomia, anemia, envelhecimento precoce, distúrbios cardiorrespiratórios e outras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO DA CLONAGEM

A produção de animais clonados utilizando núcleos de células somáticas ocorreu após inúmeras décadas de pesquisas. Spemann, em 1914 produziu larvas de salamandras a partir de núcleos de embriões no estágio de 8 a 16 células. Esse experimento foi feito utilizando cabelos de bebês para separação do citoplasma do zigoto. No ano de 1938, ele ainda propôs “um experimento fantástico”, assim chamado por ele, que consistia em isolar núcleos de embriões no estágio de mórula e depois fazer a transferência para o citoplasma de ovócitos enucleados (BORDIGNON, 2008).

No entanto, somente em 1951, na Filadélfia, foi realizada com sucesso a primeira transferência nuclear. Os pesquisadores enuclearam ovócitos de rã e os fundiram com células embrionárias no estágio de blástula (BRIGG & KING, 1951). Logo depois, nas décadas de 1960 e 1970, foram produzidos clones a partir de núcleos de células intestinais de rãs no estágio de girino (DI BERARDINO, 2001).

Já em mamíferos, o primeiro sucesso obtido com a clonagem ocorreu em camundongos. Durante o experimento os pesquisadores obtiveram o nascimento de três camundongos clonados, utilizando células embrionárias (ILLMENSEE & HOPPE, 1981).

No ano de 1984, Mcgrath e Solter repetiram os experimentos de Illmensee e Hoppe (1981), com núcleos mais avançados, mas não obtiveram êxito, mostrando assim que a clonagem em mamíferos ainda precisava de muitos estudos. O primeiro pesquisador a obter resultados animadores com a transferência nuclear em animais domésticos de importância econômica foi o dinamarquês Willadsen (1986), utilizando ovócitos de ovelhas maturados *in vivo* e obtendo o nascimento de três cordeiros produzidos a partir de núcleos de embriões de 8 a 16 células (MELLO, 2003).

Desde então, várias espécies de mamíferos (ratos, porcos, bovinos, coelhos, caprinos, gatos, macacos, cães e cavalos) foram clonados, embora com eficiência relativamente baixa (RHIND et al., 2003).

No dia 5 de julho de 1996, nasceu, no Reino Unido, a ovelha Dolly, sendo ela o primeiro mamífero e a primeira clonagem resultante de transferência nuclear de

células somáticas da glândula mamária, que são células adultas diferenciadas (NEVES & FEVEREIRO, 2006; WILMUT et al., 2007).

Foi após o nascimento e mediante os resultados obtidos com a Dolly, que aumentou o interesse pelo uso da transferência nuclear, principalmente para fins terapêuticos em seres humanos. Foi criada uma expectativa do uso da clonagem para o tratamento de diversas doenças até então incuráveis, tais como: Alzheimer, Parkinson, diabetes, insuficiência cardíaca, doenças degenerativas das articulações e outros problemas similares. Seu uso também poderia auxiliar na preservação de animais em vias de extinção, além do interesse em multiplicar animais de alto valor genético (FARIA & ROMERO, 2002; BORDIGNON, 2008).

Em dezembro de 1997, Schnieke e colaboradores, relataram o nascimento de clones de ovelhas originadas da transferência nuclear de fibroblastos fetais primários, sendo produzidos ovinos transgênicos para o fator IX de coagulação sanguínea humana. No ano seguinte, nasceu na França uma bezerra, Marguerite, na qual foi utilizada célula muscular embrionária para transferência nuclear (PENA, 1999).

No ano de 1999, Wells et al., na Nova Zelândia, relataram o nascimento de dez bezerras clonadas por transferência de células somáticas de uma vaca adulta de alta qualidade. A eficiência da clonagem foi de 10% e todas as bezerras sobreviveram.

O primeiro clone produzido no Brasil nasceu no dia 17 de março de 2001, a Vitória, bovino fêmea da raça Simental, produzida a partir de célula embrionária. Desde então, outros clones bovinos passaram a ser produzidos no país. Em abril de 2002, nasceu em Monte Mor-SP, o Marcolino da USP, produzido a partir de célula diferenciada jovem (fibroblasto fetal). Em julho de 2002, na cidade de Jaboticabal em São Paulo, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada adulta, a Penta (MELLO, 2003; VISINTIN et al., 2008).

Em 2003, nasceu no Centro Experimental Sucupira, pertencente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a Lenda, bezerra da raça holandesa que foi clonada a partir de células da granulosa oriundas de um óvulo que foi retirado do ovário de uma vaca morta (IGUMA et al., 2003 apud NEVES et al., 2010).

O primeiro clone do clone da América Latina nasceu em fevereiro de 2004, foi produzido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sendo chamada de Vitoriosa e a célula doadora de núcleo foi retirada da orelha da vaca Vitória (NEVES et al., 2010).

Em abril de 2005, nasceram os clones bovinos, Porã (Figura 1) e Potira, desenvolvidos a partir de células somáticas isoladas de um pedaço de pele da orelha de uma mesma vaca doadora da raça Junqueira. Essa raça faz parte do Programa de Conservação e Uso de Recursos Genéticos Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o que torna Porã e Potira um elo entre a moderna biotecnologia animal e a conservação de recursos genéticos (EMBRAPA, 2007). A Porã ainda permanece viva até os dias atuais na Fazenda Sucupira da Embrapa, em Brasília, DF.

No dia 23 de abril de 2013, nasceu em Brasília nas dependências do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL), localizado no Gama (DF), a bezerra Brasília. Ela é produto da transferência Nuclear utilizando células do tecido adiposo, sendo essa a primeira experiência bem-sucedida utilizando esse tipo de célula (EMBRAPA, 2013).



Figura 1 - Porã, clone bovino da raça Junqueira.

2.2 ANORMALIDADES EM CLONES BOVINOS

2.2.1 Placentação

Segundo estudos realizados ao longo dos anos, os distúrbios na placentação de animais tem uma relação direta com as anormalidades apresentadas pelos clones. Falhas no desenvolvimento ou na função placentária são as principais causas de perdas de prenhez no início da gestação, formação de hidroalantóide e anomalias (HEYMAN et al.,2002; LEE et al.,2004; BIRGEL et al.,2011).

Os distúrbios na placentação caracterizam-se por números inferiores de placentomas, presença de placentomas gigantes (Figura 2), grande quantidade de

microcotilédones acessórios (Figura 3) com diâmetro menor que 1,0 cm, extensas áreas sem placentomas na membrana corioalantóide, edema das membranas placentárias e aumento da espessura do cordão umbilical (HILL et al., 2000; MIGLINO et al., 2007).

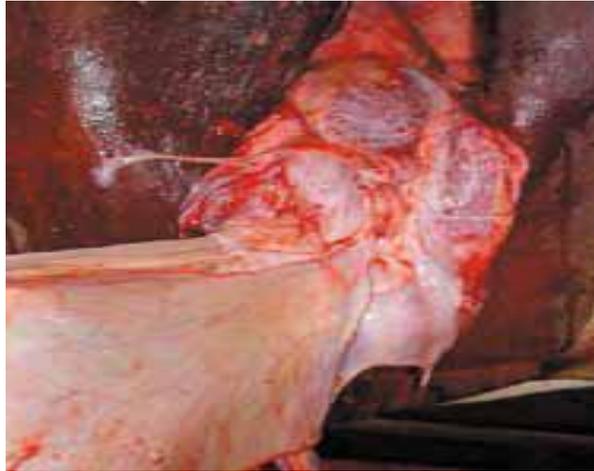


Figura 2 - Placentomas gigantes. Fonte: BIRGEL et al.(2011)



Figura 3 - Microcotilédones acessórios (< 1,0 cm). Fonte: BIRGEL et al.(2011)

Acredita-se que o aumento de tamanho dos placentomas seja devido à tentativa de compensar um número reduzido dos mesmos (CHAVATTE-PALMER et al., 2002). Panarace et al.(2007), utilizando a avaliação ultrassonográfica para estimar a viabilidade fetal de bovinos clonados, correlacionaram a observação de edema placentário, número reduzido de placentomas e tamanho dos mesmos aumentado ao maior risco de aborto.

Além de estarem associados com a perda de gestações, os problemas de placentação também podem prejudicar o crescimento e a viabilidade dos fetos. Observaram ainda, em bovinos, uma expressão anormal do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I nas células do trofoblasto e um maior acúmulo de linfócitos T no endométrio de gestações de clones (HILL et al., 2002). Esses achados sugerem que uma reação imunológica pode contribuir para a alta incidência de abortos (BORDIGNON, 2008).

As razões pelas quais ocorrem tais alterações ainda não foram completamente elucidadas, no entanto, pesquisas indicam que seja devido a falhas na reprogramação celular levando a modificações epigenéticas dos principais genes reguladores, os quais são essenciais para o desenvolvimento da placenta normal (PALMIERI et al., 2008).

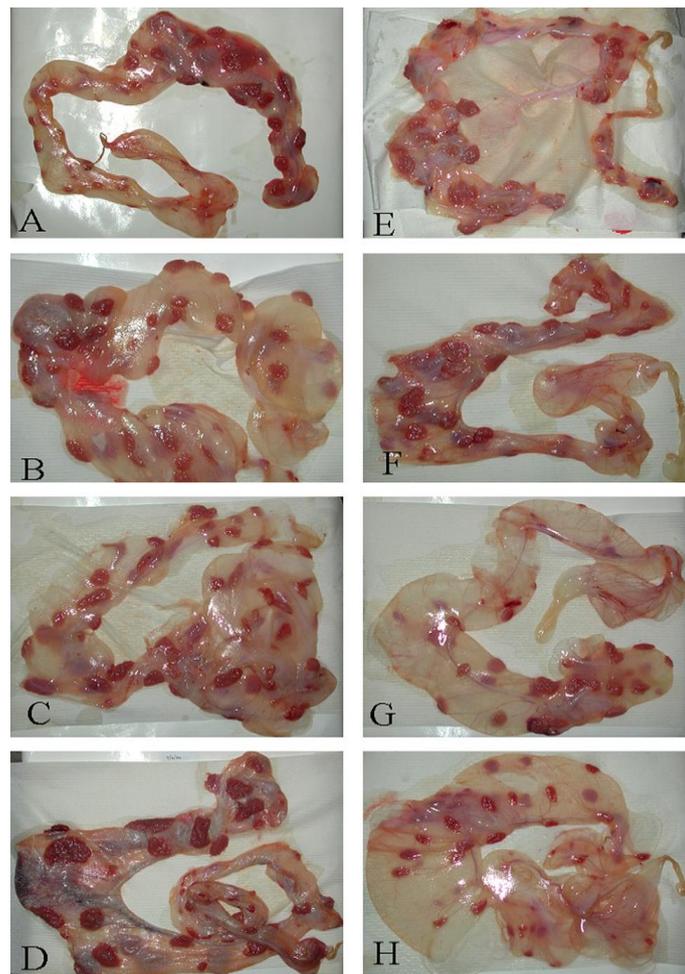


Figura 4 - A-D placenta de clones, E-H placenta de animais produzidos *in vivo*

Fonte: LONERGAN et al. (2007)

2.2.2 Hidroalantóide

O hidroalantóide é uma anormalidade que se caracteriza por uma falha no balanceamento dos fluidos pela placenta devido a alterações placentárias em que a vascularização fica comprometida (YAMAZAKI, 2006). Constant et al. (2003) apud MIGLINO (2004) afirmaram que essa anomalia está associada a uma elevada concentração plasmática materna da glicoproteína (PSP60). A PSP60 é produzida pelas células trofoblásticas binucleadas as quais desenvolvem um processo migratório em direção ao epitélio uterino.

Essa patologia pode levar a um quadro de hipóxia fetal, seguido de distúrbios hematológicos (YAMAZAKI, 2006). Perdas decorrentes desse tipo de alteração placentária são frequentes na segunda metade da gestação (CONSTANT et al., 2006).

Heyman et al. (2002) durante seu experimento com clones bovinos utilizando a técnica de ultrassonografia transabdominal para monitoramento da gestação, detectaram a presença de hidroalantóide durante a gestação. Segundo os autores, a presença dessa anormalidade levou a um quadro desfavorável para a receptora, uma vez que ela apresentava perda do apetite e da condição corporal.

Estudos iniciais indicam que 27% das receptoras de embriões originários de transferência nuclear, desenvolvem hidroalantoide após 120 dias de gestação (OBACK & WELLS, 2003 apud PEREIRA & FREITAS 2009). Esse valor é muito superior aos 0,02% a 0,6% obtidos em programas de monta ou inseminação artificial, respectivamente (THIBAUT, 2003 apud PEREIRA & FREITAS, 2009).

Segundo o artigo publicado na IETS (2008), durante a gestação a possibilidade de hidroalantóide deve ser considerada quando duas ou mais das seguintes características forem observadas: útero aumentado de volume durante a palpação retal devido à presença de líquido; imagem hiperecótica, placentomas maiores que o normal, edemaciados observados por ultrassom via retal; rápido aumento da circunferência abdominal (>10 cm/semana); sinais clínicos como distensão abdominal, difícil deambulação e anorexia.

2.2.3 Hipóxia/Sufrimento fetal

A hipóxia ou sofrimento fetal é uma anormalidade que pode estar presente em bovinos clonados. Cerca de 50% dos animais clonados sofrem hipóxia, possuindo maior incidência de mortalidade nos primeiros dois dias pós-parto caso os bezerros tenham sido tingidos pelo mecônio (Figura 5). O principal fator responsável pela sua instalação são as disfunções placentárias (BIRGEL et al., 2011).



Figura 5 - Clone tingido de mecônio - sinal de hipóxia durante a vida intrauterina

Fonte: BIRGEL et al. (2011)

Ao que parece, as trocas materno-fetais deficientes que ocorrem em consequência dessa disfunção, provocam o comprometimento das trocas gasosas e consequentemente à diminuição da pressão parcial de oxigênio (pO_2) no feto. Isso gera alterações hemodinâmicas com o objetivo de economizar oxigênio circulante, através da vasodilatação em órgãos vitais (sistema nervoso central, coração e adrenais do feto) e vasoconstrição generalizada, atingindo entre outros, sistema músculo esquelético, hepático, renal, pulmonar e derme, o que impõe grande sofrimento fetal. Sendo assim, animais clonados que apresentam esse quadro associado com aspiração de mecônio durante a gestação podem ter o sistema cardiorrespiratório comprometido, pois a aspiração desse elemento leva a um processo inflamatório dos pulmões (KOMNINO, 2008).

Nunes (2009), acompanhando a carditocografia de fetos clonados, constatou a presença de traçados carditocográficos compatíveis com a ocorrência de hipóxia intrauterina e que, na fase final da gestação entre 90 e 30 dias antes do parto, existem sinais de hipóxia fetal caracterizada por hipoatividade do feto e ausência de resposta

cardíaca à estimulação fetal por beliscamento do espaço interdigital. Ele relatou também que os bezerros asfixiados apresentavam ausência de reflexo de sucção e dificuldade de permanecer em decúbito esternal, o que dificultada a ingestão do colostro nas primeiras horas de vida.

2.2.4 Macrossomia

A macrossomia é uma anomalia comum em clones bovinos, sendo o fenômeno chamado de síndrome do bezerro grande do inglês "*large calf syndrome*" (BIRGEL et al., 2011; FARIN et al., 2006; CHAVATTE-PALMER, 2004). Entretanto, essa síndrome não ocorre exclusivamente em embriões clonados, mas também afeta embriões produzidos ou manipulados *in vitro* (YOUNG et al., 1998). Os clones afetados nascem com peso superior ao de neonatos normais, apresentam placentas edematosas, umbigo grosso e vasos umbilicais aumentados (YOUNG et al., 1998; WILMUT et al., 2002)

Segundo Garry et al. (1996), a macrossomia parece estar restrita ao crescimento intrauterino, pois após o nascimento a variação de peso e a taxa de crescimento de clones e controles mostra-se bastante semelhante.

Essa anomalia é mais frequente em clones de ruminantes oriundos da TNCS (Transferência nuclear de células somáticas) de animais adultos quando comparado TNCS de células embrionárias. Estima-se, que 20 a 30% dos bezerros nascidos por esta técnica apresentem o problema (GARRY et al., 1996; WILMUT et al., 2002), que por sua vez está fortemente associado à alta mortalidade (POGLIANI, 2010).

Diversos estudos sugerem que o crescimento fetal anormal pode estar relacionado com deficiências placentárias (YOUNG et al., 2001). Já o fato da macrossomia ser mais comum em clones produzidos por TNCS de animais adultos pode ser explicado pela pressuposição de que os núcleos de células embrionárias necessitam de menor reprogramação do que os provenientes de células somáticas adultas (BORDIGNON, 2008). Sendo assim, são as alterações dos padrões epigenéticos que provocam alteração na expressão de genes importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento da placenta e do feto (CHAVATTE-PALMER et al., 2002; FARIN, FARIN, & PIEDRAHITA, 2004).

Os estágios embrionários em que podem ocorrer alterações no desenvolvimento não são conhecidos, mas existem duas hipóteses. Uma sugere que

estímulos inadequados, em qualquer estágio do desenvolvimento antes da eclosão do blastocisto, podem levar ao crescimento excessivo do feto, enquanto a outra sugere que um estágio específico do desenvolvimento é vulnerável. Se houver apenas uma fase vulnerável, esta pode ser no momento em que o genoma embrionário assume o controle do desenvolvimento (YOUNG et al., 1998).

Nos estudos realizados por Lee et al. (2004), foi relatado que a macrossomia se desenvolve ainda no primeiro terço da gestação. Por volta do 100º dia de gestação, fetos clonados já exibem desregulação do crescimento e 17% daqueles que sobrevivem até o 150º dia de gestação são mais pesados.

Santos (2008), afirmou que esse tipo de anomalia apresenta uma taxa de aproximadamente 30% de mortalidade antes do desmame dos animais.

2.2.5 Anemia

Komninou (2008) observou durante seu experimento a ocorrência de anemia de grau moderado a grave, do tipo normocítica normocrômica, sendo que a mesma instalou-se progressivamente a partir das 12 horas de vida do clone, atingindo sua intensidade máxima ao final da primeira semana, mas a partir do 15º dia de vida, ocorreu gradativa recuperação dos valores. A anemia observada por ele era de origem ferropriva, pois se evidenciou nesses animais níveis séricos de ferro inferiores aos normais e uma diminuição do índice de saturação da transferrina (ist), enquanto os valores da capacidade total de ligação de ferro (CTLF) não sofreram influência durante o período. Anemia também foi relatada no artigo publicado em 1996 por Garry e colaboradores.

2.2.6 Distúrbios Cardiorrespiratórios

Vários estudiosos em clones atribuíram a causa desses distúrbios às possíveis alterações de conformação e funcionamento da glândula adrenal, baixos níveis de cortisol fetal e insuficiência de surfactantes pulmonares no neonato (KOMNINO, 2008).

Já Hill et al. (1999) apud (SILVA, 2013), sugeriram que estas anormalidades observadas nos bezerros e nos fetos clonados teriam ocorrido no útero vinculadas às

anomalias placentárias, tendo a clonagem e as condições de cultivo embrionário colaborado para tal.

Meirelles et al. (2010), no trabalho realizado com bezerros zebuínos clonados também relataram que a maioria das anormalidades cardíacas e respiratórias pode estar relacionada a insuficiente placentação e afirmaram que caso os clones não recebam uma boa monitoração, estes problemas podem evoluir para um desequilíbrio ácido-base, podendo ainda evoluir para uma acidose respiratória ou metabólica.

Foram observados em experimentos realizados na Universidade de São Paulo (USP), distúrbios tais como: hiperfonese, reforço de bulhas, presença de sopros cardíacos na 1^o e 2^o bulhas associados à dispneias, respiração rude, estertores e diminuição dos valores da pO₂, no sangue arterial (MEIRELLES et al., 2010 apud BIRGEL et al., 2011).

Santos (2010), durante necropsia realizada em clones do seu experimento observou alterações no sistema respiratório e cardíaco. Segundo o autor, todos os animais presentes na necropsia apresentaram por toda extensão da traquéia, líquido de aspecto areado e com presença de mecônio proveniente da aspiração. Observou também, enfisema pulmonar difuso em todos os lobos, atelectasia pulmonar difusa e edema pulmonar, que foi confirmada pelo extravasamento de líquido seroso do parênquima pulmonar após o corte, além disso, observou hemorragia e congestão pulmonar com o extravasamento de líquido sero-hemorrágico. O coração e os grandes vasos apresentaram alterações e malformações no desenvolvimento como por exemplo: cistos hemáticos (Figura 6) de aproximadamente 5 mm de diâmetro com os maiores medindo 2 cm de diâmetro em valvas tricúspides e mitrais, em alta severidade, o que destoava do padrão considerado normal para bezerros neonatos. Nos registros da necropsia ainda relatou persistência do forame oval e defeito do septo intraventricular, patência de ducto arterial, dilatação do ventrículo direito, espessamento de trabécula septo marginal esquerda, hipertrofia excêntrica de miocárdio ventricular direito e esquerdo e inserção de cordas tendíneas em septo interventricular do ventrículo esquerdo. Outras alterações como: sufusões e vibíces em miocárdios direito e esquerdo, dilatação de grau leve de ventrículo direito, espessamento de cúspide septal da valva mitral, justaposição de músculos papilares, inserção de cordas tendíneas à parede ventricular lateral direita e justaposição de valvas tricúspide e mitral à parede cardíaca lateral direita e esquerda, respectivamente também foram observadas.

Pogliani (2010), utilizando do exame de ecocardiografia, notou a presença de comunicação interatrial devido à persistência do forãme oval, fluxo turbulento sistólico no interior do átrio direito, indicando a existência de insuficiência da valva tricúspide e hipertrofia concêntrica do miocárdio. Renard et al.,(1999) apud (SANTOS, 2008), utilizando o mesmo exame logo após o nascimento dos clones observou uma dilatação do ventrículo direito e hiperplasia severa do ventrículo esquerdo nos animais.



Figura 6 - Cistos hemáticos (seta) valvas atrioventriculares. Fonte: BIRGEL et al. (2011)

2.2.7 Envelhecimento Precoce

O envelhecimento precoce está relacionado com atividade dos telômeros (do grego, telos = fim). Estes são responsáveis pela manutenção da integridade dos cromossomos. Por ocasião da meiose, os cromossomos homólogos (do mesmo tipo) se alinham no centro da célula e depois se aproximam um do outro, e aí ocorre o pareamento. Admite-se que o pareamento cromossômico se inicie pela região do telômero, formada de uma sequência de DNA que se repete várias vezes e na qual diversas proteínas se ligam. A cada vez que a célula se divide, os telômeros sofrem pequeno encurtamento. A reconstituição de cada extremidade após a divisão celular se deve a enzima telomerase. No entanto, a atividade dessa enzima se reduz com o passar do tempo e os telômeros tendem a ficar mais curtos, culminado com a morte celular (apoptose) (PEREIRA, 2004).

O mais famoso exemplo disto é a ovelha Dolly. Quando foram examinados seus telômeros, observou-se que eles se apresentavam mais curtos do que o esperado para sua idade biológica, mas de tamanho semelhante ao da ovelha de seis anos de

idade que doou o núcleo (SHIELS et al., 1999). Outros estudos, no entanto, têm mostrado que animais clonados por TNCS não tem telômeros mais curtos; em alguns casos, de fato, os animais tiveram telômeros mais longos do que os animais doadores. Sendo assim, a evidência é inconclusiva, mas parece sugerir que o comprimento dos telômeros depende não apenas da idade do animal doador, mas também uma série de parâmetros, incluindo o tipo de célula, cultura de células, processo de transferência nuclear, a amostragem e o protocolo de medição (XU & YANG, 2003).

2.2.8 Outras anomalias:

Alopecia (Figura 7) foi observada em clones da raça nelore com idade entre 15 e 30 dias de vida. Acredita-se que essa anomalia possa estar ligada a distúrbios na produção e absorção de vitaminas, pois a suplementação dos bezerros com complexo vitamínico ADE diminuiu a alopecia (BIRGEL et al., 2011).



Figura 7 - Alopecia. Fonte: BIRGEL et al. (2011)

Aumento da espessura do cordão umbilical (Figura 8) e persistência do canal do úraco também foram observados em clones (GARRY et al., 1996; WILMUT et al., 2002; LEE et al., 2004; PANARACE et al., 2007). O aumento da espessura dificulta a ruptura espontânea ao nascimento e as artérias umbilicais não sofrem retração para a cavidade abdominal, ficando exposta nos resquícios do cordão umbilical (BIRGEL et al., 2011).



Figura 8 - Aumento da espessura do cordão umbilical. Fonte: BIRGEL et al. (2011)

Durante necropsia algumas alterações foram encontradas: congestão hepática, parênquima com coloração levemente amarelada e com bordas irregulares (SANTOS, 2010), quantidade de gordura envolvendo órgãos abdominais (CHAVATTE-PALMER et al., 2002) fígado aumentado de tamanho e com bordos arredondados com deposição de gordura superficial (figura 9) (SILVA, 2013). Essas alterações no fígado também foram relatadas em artigos publicados por Hill et al., 2000; De Sousa et al., 2001; Heyman et al., 2002.

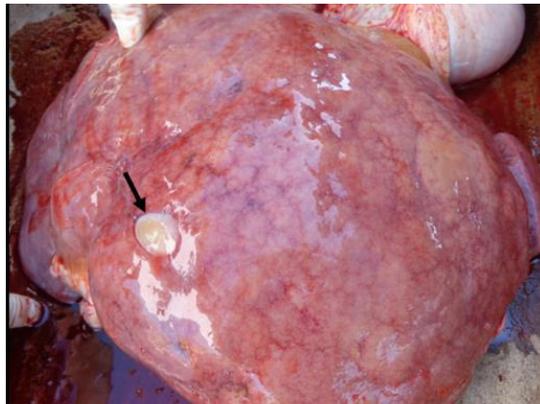


Figura 9 - Fígado retirado de animal clonado, com bordos arredondados e gordura na superfície (seta). Fonte: SILVA, (2013)

Hipertermia paradoxal foi observada em clones de até três semanas de vida, apresentando picos de temperatura de até 41,8°C sem quaisquer alterações clínicas. Sugere-se que as alterações na temperatura podem estar relacionadas à menor síntese de hormônios tireoidianos, pois concentrações plasmáticas de tiroxina (T4) foram menores nos clones que nos controles (CHAVATTE-PALMER et al., 2002).

Problemas posturais e musculoesqueléticos tais como: aumento das dimensões das articulações metacarpofalangeana e metatarsofalangeana (Figura 10) (SANTOS, 2010), contratura de tendão, luxação de patela e poliartrite fibrinosa são comumente relatados (GARRY et al., 1996; PANARACE et al., 2007).



Figura 10 - Aumento das dimensões das articulações metacarpofalangeana e metatarsofalangeana. Fonte: SANTOS. (2010)

No clone produzido a partir de células do fluido amniótico algumas anormalidades também foram evidenciadas, como por exemplo: dentes não completamente enrijecidos, caracterizando imaturidade, flexão bilateral das articulações metatarsofalangeanas (Figura 11) e cavidade torácica com presença de líquido de aspecto seroso, caracterizando um hidrotórax seroso (Figura 12) (SILVA, 2013).



Figura 11 - Animal clonado apresentando flexão das articulações metatarsofalangeanas. Fonte: SILVA, (2013)

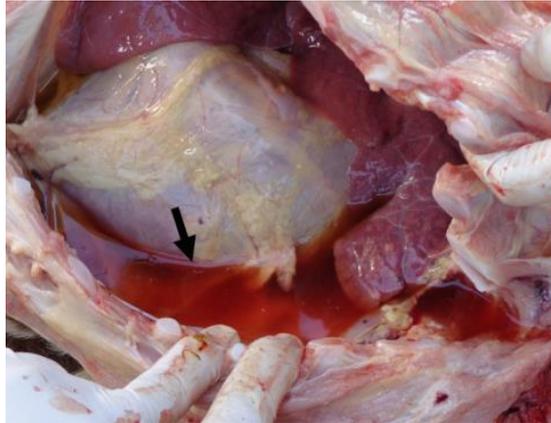


Figura 92 - Hidrotórax seroso. Fonte: SILVA, (2013)

Wilmot et al. (2002), relatou distúrbios no sistema nervoso central, como por exemplo: hidrocefalia, anormalidades estruturais do cérebro e edema cerebral.

Nos rins foram observadas alterações em relação ao tamanho do órgão apresentando-se aumentado e com acúmulo de gordura disperso na cápsula, alguns com aparência disforme. Também é descrita pielonefrite secundária à infecção umbilical (CHAVATTE-PALMER et al., 2002; LEE et al., 2004).

2.2.9 Principais causas das anomalias:

Embora a técnica de clonagem em bovinos esteja sendo bastante realizada nos dias atuais, verifica-se que ainda existe baixa eficiência no desenvolvimento dos clones (YAMAZAKI, 2006), levando os animais a apresentarem determinadas anomalias.

A eficiência da técnica ainda deixa muito a desejar quando comparada com a técnica de inseminação artificial (IA) e produção *in vitro* (PIV), pois apenas 5% dos embriões clonados produzem animais a termo (HEYMAN et al., 2002).

Vários fatores podem estar relacionados com os baixos resultados da clonagem, um dos mais importantes está ligado a falhas na reprogramação epigenética, principalmente ao *imprinting genômico* (YAMAZAKI, 2006).

A reprogramação epigenética ocorre quando o padrão de expressão de uma célula diferenciada é abolido e o novo padrão de expressão gênica embrionária é estabelecido, a fim de direcionar o desenvolvimento embrionário e fetal (NIEMANN & LUCAS HAHN, 2012). Para isso o núcleo transferido deve suprimir genes associados à

diferenciação, que foram transcritos na célula doadora original (JAENISCH et al., 2002). Sendo assim, acredita-se que uma reprogramação inadequada no núcleo após a TN (Transferência nuclear) seja a responsável pela falha no desenvolvimento de clones.

Segundo Yamazaki (2006), genes *imprinted* caracterizam-se por expressarem apenas um dos alelos parentais em estágio específico do desenvolvimento. Alguns desses genes tais como os: IGF2, IGF2R e H19, são importantes no desenvolvimento fetal e placentário. Alterações neles podem gerar vários distúrbios placentários.

A baixa eficiência da TN também pode estar associada à fonte de células doadora de núcleo, pois quanto menor o grau de diferenciação de uma célula, mais potencialmente ela será desprogramada pelo citoplasma receptor (SILVA, 2013). Segundo Campbell et al. (2007), essa baixa eficiência também pode estar relacionada com cultivo prolongado das células doadoras, pois ele pode alterar a ploidia, estabilidade genômica e provocar modificações nas histonas pós-tradução.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

De acordo com o exposto, pode ser verificado que a transferência nuclear em bovinos tem gerado várias anomalias nos animais clonados, sendo assim inúmeros estudos ainda são necessários para que melhores resultados sejam obtidos no processo de clonagem. A maior parte desses estudos deve ser focada principalmente na tentativa de compreender os mecanismos moleculares de reprogramação epigenética já que alterações nessa área são responsáveis por comprometer o desenvolvimento dos animais. A necessidade de maiores avanços com relação a essa biotecnologia é fundamental, não só por ter eficiência baixa, mas também por apresentar algumas limitações com relação ao bem-estar animal, incluindo a saúde.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIRGEL JUNIOR, E.H.; MEIRELLES, F.V.; MAIORKA, P.C.; KUBRUSLY, F.S.; OLLHOFF, R.D. **Medicina interna de bezerros clonados – Distúrbios clínicos observados nos primeiros 30 dias de vida / Internal medicine of cloned calf – Clinical disorders observed during the first 30 days of life** / Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária, 2011.

BORDIGNON, Vilceu. **Clonagem animal por transferência nuclear**. In: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias et al. (Org). Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. v. 2.. São Paulo: Roca, 2008.

BRIGGS, R.; KING, T. J. **Transplantation of living nuclei from blástula cells in to enucleated frogs eggs**. Proceeding of the National Academic Society, v. 38, n.4, p.455 - 463, 1951.

CAMPBELL KHS.; FISHER.; CHEN WC.; CHOI I.; KELLY RDW.; LEE JH.; XHU J. **Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives**. Theriogenology, v.68, p.214 - 231, 2007.

CHAVATTE-PALMER, Pascale et al. **Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells**. Biology of reproduction, v. 66, n. 6, p. 1596-1603, 2002.

CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N. **Health status of cloned cattle at different ages**. Cloning Stem Cells, v.6, p.94 -100, 2004.

CONSTANT, F. et al. **Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois**. Biology of reproduction, v. 75, n. 1, p. 122 - 130, 2006.

DE SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K., & WILMUT, I. **Evaluation of Gestation al Deficiencies in Cloned Sheep Fetuses and Placentae**. *Biology of reproduction*, 65, 23-30. 2001.

DI BERARDINO, Marie A. **Animal cloning – the route to new genomics in agriculture and medicine**. *Differentiation*, v. 68, n. 2, p. 67- 83, 2001.

EMBRAPA (BR), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Bezerra Brasília é o novo clone da Embrapa**. Brasília: Embrapa, 2007. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/noticia_completa/461/> Acesso em: 28/10/2014.

EMBRAPA (BR), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: **Bezerra Brasília é o novo clone da Embrapa**. Brasília: Embrapa, 2013. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-noticias/-/noticia/1491024/bezerra-brasilia-e-o-novo-clone-da-embrapa>> Acesso em: 28/10/2014.

FARIA, C. R. S. M.; ROMERO, L. C. P. **Clonagem Humana**. *Senatus* - v.2, n.1, p. 16 a 23, 2012 (dezembro 2002), disponível em: <<http://www2.senado.leg.br/bdsf/bitstream/handle/id/70291/0657212%20Clonagem%20Humana.pdf?sequence=3>> Acesso em: 01/11/2014.

FARIN, C. E, FARIN, P. W, & PIEDRAHITA, J. A. **Development of fetuses from in vitro–produced and cloned bovine embryos**. *Journal of Animal Science*, 82(E), p.53–62. 2004.

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

GARRY F. B.; ADAMS R.; MCCANN J.P. & ODDE G. – **Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning**. *Theriogenology*, 45, 141-152, 1996.

GUIMARÃES, C. F.; MEIRELLES, M. G.; OLIVEIRA, B. M. M.; POGLIANI, F. C.; FERNANDES, C. B. Clonagem em ruminantes: anomalias placentárias e disfunções perinatais, *Veterinária em Foco*, v.9, n.2, 2012.

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

HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K., LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. **Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuse.** *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

Hill, J. R., et al. **Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies associated with a pronounced endometrial lymphocytic response.** *Biology of reproduction*, v, 67, p. 155-63, 2002.

IETS. Health And Sanitary Advisory Committee (HASAC), **Health Assessment and Care for Animals Involved in the Cloning Process**, A consensus recommendation from the International Embryo Transfer Society, 15 Maio 2008. Disponível em: <<http://www.iets.org/pdf/hasac-healthassessmentcare.pdf>> Acesso em : 23/11/2014.

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

JAENISCH, R.; EGGAN, K.; HUMPHERYS, D.; RIDEOUT, W.; HOCHEDLINGER, K. **Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming.** *Cloning and Stem Cells* v. 4, p. 389-396, 2002.

KOMNINO, Eliza Rossi. **Contribuição ao estudo da hematologia de bezerros da raça nelore, originados por meio da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS)-Clonagem.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008

LEE, Rita SF et al. **Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester.** *Biology of reproduction*, v. 70, n. 1, p. 1-11, 2004.

LONERGAN, P. et al. **Pregnancy and fetal characteristic safter transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos.** *Theriogenology*, v. 68, n. 8, p. 1128-1137, 2007.

MEIRELLES, Flávio V. et al. **Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*).** *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, n. 1, p. 88-97, 2010.

MELLO, M. R. B. Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2003

MIGLINO, M. A. **Clonagem animal e placentação.** *Acta Scientiae Veterinariae. Supl.* 32, p.75-78, 2004.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T. V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; AMBROSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, A. F.; LEISER, R.; CARTER, A. M. **Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture.** *Theriogenology*, v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.

NEVES, M. P.; FEVEREIRO, P. Relatório Sobre Clonagem Humana. Conselho Nacional de Ética para as ciências da vida, n 48. 2006.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. **Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.414-421, 2010 (supl.especial)

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. **Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation**. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 2-10, 2012.

NUNES, M. T. **O uso da cardiocografia como método de diagnóstico da ocorrência de sofrimento fetal (hipóxia fetal) durante a vida intrauterina de fetos da raça Nelores originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas adultas**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PALMIERI, C. LOI. P.; PTAK, G.; & DELLA SALDA, L. **Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice**. *Veterinary Pathology*, v. 45(6), p.865–880. 2008.

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

PENA, S. **Clonagem humana**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 11, p. 113-122, 1999.

PEREIRA, J. C. C. **Aplicação da Biotecnologia Reprodutiva no Melhoramento Animal**. *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal*. v. 4, Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004.

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. **Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118-128, 2009.

POGLIANI, F. C. **Parâmetros ecodopplercardiográficos em bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas**

– **Clonagem.** Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RHIND, SUSAN M.; TAYLOR, JANE E.; DE SOUSA, PAUL A.; KING, TIM J.; MCGARRY, MICHELLE & WILMUT, IAN. **Human cloning: can it be made safe?** Nature Reviews Genetics, v.4, p. 855-864, 2003.

SANTOS, C. R. **Patologia de neonatos bovinos clonados. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTOS, C. R. et al. **Patologia de neonatos bovinos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas: clonagem.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 47, n. 6, p. 447-453, 2010.

SHIELS, P.G.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H.; WADDINGTON, D.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A.E. **Analysis of telomere lengths in cloned sheep.** Nature 399, 316–317,1999.

SILVA, C. G. **Isolamento, criopreservação e utilização de células do cordão umbilical, células do tecido adiposo e células do líquido amniótico para produção de embriões bovinos por transferência nuclear (clonagem).** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 2013.

VISINTIN, J.A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. **Bioteecnologias da reprodução animal, Clonagem e transgenia animal.** Ciência veterinária Tróp, v. 11, suplemento 1, p.139-144, 2008.

WELLS DN.; MISICA PM.; TERVIT HR. **Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells.** Biol. Reprod. v. 60, p. 996-1005, 1999.

WILMUT, I. et al. **Somatic cell nuclear transfer.** Nature, v. 419, n. 6907, p. 583, 2002.

WILMUT, I. et al. **Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.** Cloning and stem cells, v. 9, n. 1, p. 3-7, 2007.

XU J.; YANG X. **Will cloned animals suffer premature aging - the story at the end of clone's chromosomes.** Reprod Biol Endocrinol. v. 1, p. 105-110, 2003.

YAMAZAKI, Walt. **Estudo do “genomic imprinting” na placenta de clones bovinos.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. 2006.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D. and WILMUT, I. **Large offspring syndrome in cattle and sheep.** Journals of Reproduction and Fertility, v. 3, p.155–163. 1998.

YOUNG, L.E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K.D. **Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal over growth after sheep embryo culture.** Nature Genetics v. 27, p. 153-154, 2001.

5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

5.1. INTRODUÇÃO

O estágio é de caráter obrigatório para conclusão do curso de Medicina Veterinária na Universidade de Brasília (UnB). O mesmo foi realizado em duas etapas. A primeira etapa do estágio foi realizada no período de 01 de setembro a 23 de outubro de 2014, no Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL), Gama-DF e a segunda etapa realizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (CES) pertencente a mesma, no período de 27 de outubro a 9 de dezembro do mesmo ano.

O CTZL é uma unidade da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizado no Núcleo Rural Ponte Alta, no Gama (DF), teve iniciativa conjunta das Unidades Cerrados (Planaltina – DF), Gado de Leite (Juiz de Fora – MG) e Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília – DF), recebeu apoio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério do Desenvolvimento Agrário, Ministério da Ciência e Tecnologia, Emater-DF, CNPq, Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ) e Associações de Criadores de Raças Zebuínas Leiteiras (Gir, Guzerá, Indubrasil e Sindi).

Melhorar a qualidade do rebanho brasileiro, criar um selo de qualidade para identificar germoplasma zebuino trabalhado e oferecer treinamento a agricultores, extensionistas e estudantes são alguns dos objetivos que justificaram a criação do CTZL.

Nos anos 70, a Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de Centros para Conservação de Recursos Genéticos, em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Neste contexto, em 22 de novembro de 1974, a Embrapa criou o Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Na realização do estágio, a área de reprodução animal e biotecnologia da reprodução foram escolhidas com objetivo de aprofundar os conhecimentos adquiridos

durante o período da graduação, além de participar do manejo dos animais e rotina do laboratório e da fazenda.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DA PRIMEIRA ETAPA DO ESTÁGIO

Área de estágio: Biotecnologia de Reprodução Animal

Local: Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira-CTZL (EMBRAPA CERRADOS)

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Ivo Pivato

Supervisor de estágio: Dr. Carlos Frederico Martins

Período de estágio: 01 de Setembro de 2014 a 23 de Outubro de 2014.

5.2.1 PLANO DE ATIVIDADES

Atividade a serem desenvolvidas:

- Acompanhar as atividades de fecundação *in vitro* do Laboratório de Reprodução;
- Colaborar nas atividades de sincronização de receptoras e transferência de embriões;
- Acompanhar os experimentos de transferência nuclear (clonagem);
- Realizar outras atividades de manejo reprodutivo no CTZL.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DA SEGUNDA ETAPA DO ESTÁGIO

Área de estágio: Biotecnologia de Reprodução Animal

Local: Recursos Genéticos e Biotecnologia

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Ivo Pivato

Supervisor de estágio: Dr. Margot Alves Nunes Dode

Período de estágio: 27 de Outubro de 2014 a 09 de dezembro de 2014.

5.3.1 PLANO DE ATIVIDADES

Atividade a serem desenvolvidas

- Acompanhar o manejo reprodutivo do rebanho bovino, ovino e caprino do CES;

- Acompanhar avaliação da função ovariana através da palpação retal e da ultrassonografia;
- Acompanhar diagnóstico de gestação por ultrassonografia;
- Acompanhar protocolo de IATF/TETF;
- Acompanhar as atividades de OPU e PIVE;
- Acompanhar as atividades de superovulação e TE de bovinos e ovinos *in vivo*;
- Acompanhar a avaliação andrológica e congelamento de sêmen de touros;
- Acompanhar as atividades de biologia molecular e epigenética voltadas à reprodução animal;
- Participar do Journal Club;
- Elaborar relatório simplificado.

5.4. Atividades desenvolvidas

5.4.1. Inovulação de embriões produzidos por PIV

A transferência de embriões é uma biotécnica que requer experiência, conhecimento e habilidade profissional. Ela permite multiplicar fêmeas com alto valor genético, obtendo maior quantidade de descendentes se comparado ao que ela poderia produzir fisiologicamente.

Essa biotécnica foi realizada utilizando embriões produzidos *in vitro* (PIVE). Inicialmente realizou-se a colheita, maturação (MIV) e fecundação (FIV) de ovócitos de fêmeas doadoras e quando os embriões cultivados atingiram os estádios de desenvolvimento passíveis de transferência foram então transferidos para o útero das receptoras devidamente selecionadas.

As receptoras são parte essencial do programa de TE. Elas devem apresentar um ciclo estral regular, saúde reprodutiva, porte compatível com o produto a ser gestado, boa habilidade materna, potencial de produção de leite, bom temperamento, ter as condições sanitárias adequadas, ser isenta de alterações no trato genital, principalmente no útero e ovários, isentas de alterações no sistema locomotor, digestório, urinário e circulatório.

A técnica utilizada para transferência foi a transcervical. As receptoras selecionadas tiveram a região vulvar e perineal higienizadas, em seguida receberam anestesia epidural (5ml de lidocaína) e assim que a cauda apresentou perda do tônus

se prosseguiu com a transferência. Com o inovulador devidamente montado, contendo o embrião no seu interior foi feita a sua passagem pela cérvix até que ele chegasse ao corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, ocorrendo então a deposição do embrião o mais próximo possível da junção útero-tubárica.

5.4.2. Palpação retal

A palpação retal é um dos principais meios para diagnóstico de gestação em rebanhos bovinos. Para isso, as fêmeas devem ser contidas em estação, para evitar acidentes tanto com animal como com examinador. Devem ser utilizadas luvas próprias para palpação e lubrificante adequado. A técnica permite fazer o diagnóstico de prenhez desde que seja realizado após o 45º dia da inseminação, monta natural ou transferência. Durante a palpação do útero, observa-se o tamanho, simetria dos cornos uterinos, consistência, contratilidade e presença de conteúdo. O útero vazio costuma contrair durante a palpação. Em vacas jovens o útero repousa próximo à crista púbica na cavidade pélvica. Em vacas velhas em casos de conteúdo anormal e particularmente durante a prenhez e no início puerperal, o útero se desloca ventralmente na cavidade abdominal. A palpação do ovário é particularmente importante para verificar a fase do ciclo reprodutivo, é interessante ver a posição, tamanho, consistência superficial se há presença de cisto, folículos e corpo lúteo. Pela palpação retal podemos observar certas características em diferentes estágios de gestação, como:

- 32 dias: Ao realizar o beliscamento observa-se a presença de parede dupla.
- 45 dias: Já é possível observar uma assimetria entre cornos devido à formação da pequena bolsa
- 90 dias: Observa-se uma grande bolsa e o útero pode ser contornado em toda sua extensão.
- 120 dias: O útero não é mais possível de ser contornado e ele adquire formato de balão.
- 5 meses: A cérvix se encontra pesada e afunilada pra baixo devido à descida do feto.
- 6 meses: O feto atinge a região abdominal.
- 7 meses: O feto começa a se reposicionar na região pélvica, sendo possível palpar a cabeça do feto.

5.4.3. Ultrassonografia:

O exame ultrassonográfico em vacas foi realizado para se obter uma avaliação precisa da função ovariana e uterina, fazer o diagnóstico precoce de gestação e ver a viabilidade do feto, assim como avaliar o estado reprodutivo de vacas receptoras e saber se as mesmas estavam aptas a receber os embriões pré-selecionados. Utilizou-se também a técnica de Ultrassonografia com Doppler para observar a irrigação dos possíveis corpos lúteos. Depois de avaliada a condição da vaca, prosseguiu-se com a inovulação do embrião. A ultrassonografia consiste na utilização de um equipamento que emite ondas ultrassônicas e captação de ecos que formarão a imagem no display. Serve como meio complementar ao exame clínico, possibilitando o registro de imagens para serem utilizadas em laudos ou atestados clínicos.

5.4.4. “Journal Club”

O Journal Club trata-se de uma reunião semanal realizada todas as quartas-feiras, onde mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e estagiários apresentam artigos científicos aos demais estudantes, ocorrendo em seguida discussão sobre o conteúdo. É uma reunião de extrema importância, por ser uma forma de trocar ideias e discutir sobre vários assuntos.

5.4.5. Outros:

Durante o período de estágio, foi possível participar de diversas atividades que contribuíram bastante para minha formação profissional. Tive a oportunidade de trabalhar com a ordenha, aplicação de medicamentos, teste para mastite (CMT), cuidados neonatais. Ainda no CTZL pude acompanhar coleta de sangue para o exame de brucelose, exame físico para diagnóstico de febre aftosa, palpação retal, aspiração de cistos ovarianos, aspiração folicular por laparoscopia em bezerras e biopsia. Participei também do Dia de Campo na Fazenda Sucupira, onde vários trabalhos foram apresentados pelos pesquisadores e onde pudemos relembrar grande parte das aulas de biotecnologia da reprodução.

Quando no laboratório do CTZL pude acompanhar o cultivo de células do tecido adiposo para realização de clonagem e auxiliar na lavagem e esterilização de materiais.

Quadro 1- Atividades desenvolvidas durante o estágio obrigatório no Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira e na Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	Nº
Ecografia retal	7
Lavagem e esterilização de materiais de laboratório	3
Aspiração folicular de bezerras e vacas	10
Produção <i>in vitro</i> de Embriões	2
Transferência nuclear	1
Transferência de Embrião	5
Palpação retal	5
Clínica	3
Rotina da fazenda	25
Aspiração folicular de ovários de abatedouro	2
Avaliação da dinâmica folicular de bezerras	5
Manipulação hormonal em bezerras	5
Diagnóstico de gestação em vacas	3
Participação do “Journal Club”	1

5.5. Considerações finais sobre o estágio:

Devido ao pouco tempo disponível de estágio e ao período de seca durante essa época do ano não foi possível ter muitas atividades laboratoriais e de campo, mas pude aprender um pouco sobre as biotecnologias aplicadas na área de reprodução animal onde alguns procedimentos acompanhados já haviam sido explicados e demonstrados em sala de aula. Foi de enorme valia fazer o estágio nas unidades da Embrapa, pois além de ser um centro de pesquisa de referência internacional, me permitiu experiências fundamentais para minha formação profissional.