



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RAFAELLI DA SILVA ANTES

CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Brasília/DF
Maio de 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Rafaelli da Silva Antes

CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

**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
Maio de 2014

Antes, Rafaelli da Silva.

Clonagem por transferência nuclear.

Rafaelli da Silva Antes; orientação de Ivo Pivato. – Brasília, 2014.

40 p.

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

1. Bovinos. 2. Clonagem. 3. Reprogramação celular. 4. Transferência nuclear.

I. ANTES, R. S. II. Clonagem por transferência nuclear.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Rafaelli da Silva Antes.

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Clonagem por transferência nuclear.

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. O autor e o seu orientador reservam-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Rafaelli da Silva Antes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: ANTES, Rafaelli da Silva.

Título: Clonagem por transferência nuclear.

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

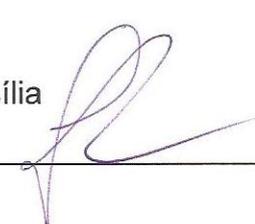
Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Instituição: Universidade de Brasília

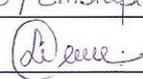
Julgamento: APROVADA

Assinatura: 

Liziane de Oliveira Leme

Instituição: UnB/Embrapa

Julgamento: APROVADA

Assinatura: 

Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: UnB

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

Aos meus pais, pelo apoio que deram durante a minha vida acadêmica. Se hoje estou concluindo esse curso em uma das melhores universidades do País, o mérito é todo de vocês. Obrigada por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido chegar até aqui com saúde e com o apoio das pessoas com as quais convivo.

Aos meus pais, Celso e Cilene e meu irmão, Nícollas, pelo apoio nesses anos de faculdade, pela companhia e pela paciência nos momentos em que eu quis desistir.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivo Pivato, pela atenção durante essa fase final do curso, pelos ensinamentos que me foram passados e pelo exemplo profissional.

Ao prof. Dr. Itiberê Saldanha, por toda a ajuda durante o curso de Medicina Veterinária e pelas oportunidades que me foram dadas.

A todo o pessoal da Embrapa CENARGEN e da Fazenda Sucupira, por todos os ensinamentos que me foram passados nesses meses de estágio, pela paciência, pelo interesse em ensinar e pela companhia durante esse tempo.

Às amigas que fizeram meus anos de faculdade se tornarem inesquecíveis: Aline, Adriana, Letícia, Gabriela, Geórgia, Nádia, Paulinha, Camilla, Camille, Sarah e Keyfanne. A companhia de vocês foi maravilhosa, muito obrigada pela amizade.

Ao meu amigo e colega Andre Simaan, pela amizade durante esses 5 anos, pelo apoio e por sempre estar comigo quando eu precisei.

À minha amiga, Carla Fernandes, que me acompanhou desde o pré vestibular até o final do curso, pela amizade, por estar sempre ao meu lado e por ser o meu ombro amigo toda a vez que eu estive estressada.

Às demais pessoas que colaboraram para o meu aprendizado, que estiveram ao meu lado e que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Clonagem por transferência nuclear

Resumo

A clonagem por transferência nuclear consiste em transferir um núcleo doador a um citoplasma receptor que é um ovócito enucleado, resultando na produção de um indivíduo geneticamente idêntico ao animal doador de núcleo. O grande interesse pela técnica é resultado da sua ampla aplicabilidade, sendo uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético de rebanhos, a produção de animais transgênicos, a preservação de espécies ameaçadas de extinção e a produção de tecidos e órgãos, além de sua aplicação no campo de pesquisa básica. Devido a inúmeros fatores a clonagem ainda é uma técnica com baixa eficiência, o que a torna alvo de diversas pesquisas e estudos que tem por objetivo o seu aperfeiçoamento.

Palavras-chave: bovinos, clonagem, reprogramação celular, transferência nuclear.

ANTES, R. S. Clonagem por transferência nuclear. [Cloning by nuclear transfer]. 2014. 40 p. Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Cloning by nuclear transfer

Abstract

Cloning by nuclear transfer is a technique that consists in transferring a donor nucleus to a recipient cytoplasm of an enucleated oocyte, resulting in a production of an individual genetically identical to the donor animal. The great interest on the technique is a result of its applicability, since its a powerful tool for genetic improvement of livestock, production of transgenic animals, the preservation of endangered species and to produce tissues and organs, as well as its application in field of basic research. Due to numerous factors, cloning is still a low efficient technique, which makes it target of several studies and researches, aiming at its improvement.

Keywords: cattle, cloning, cell reprogramming, nuclear transfer.

Lista de abreviaturas e siglas

6-DMAP = 6-*Dimethylaminopurine*

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

Embrapa = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FEC = Meio de fecundação

FIV = Fecundação *in vitro*

G₀ = Fase Quiescente, “GAP-Intervalo” zero do ciclo celular

LOS = “Large Offspring Syndrome”

MII = Metáfase II

MIV = Maturação *in vitro*

MPF = Fator promotor da fase M

PIV = Produção *in vitro*

RNA_m = Ácido Ribonucleico mensageiro

TN = Transferência Nuclear

Sumário

1	Introdução	11
2	Revisão de Literatura	12
2.1	Clonagem	12
2.2	Histórico da transferência nuclear	12
2.2.1	A clonagem no Brasil	15
2.3	Objetivos da transferência nuclear	16
2.4	Técnica de transferência nuclear	17
2.4.1	Preparação de citoplasmas receptores	18
2.4.2	Seleção e cultivo de células doadoras de núcleo	20
2.4.3	Reconstrução, fusão e ativação	22
2.4.4	Reprogramação epigenética	24
2.5	Baixa eficiência na transferência nuclear	24
3	Considerações Finais	27
4	Referências Bibliográficas	28
5	Relatório Final de Estágio Obrigatório	36
5.1	Descrição das atividades desenvolvidas	36
5.1.1	Aspiração de ovócitos em ovários de abatedouros	37
5.1.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões	38
5.2	Considerações finais sobre o estágio	39

1 Introdução

Nos últimos anos houve uma grande evolução da tecnologia de transferência nuclear (TN), que consiste na transferência de um núcleo doador para um citoplasma receptor, que é um ovócito enucleado, e permite a produção de animais geneticamente idênticos, sendo também de grande interesse para a comunidade científica.

O grande interesse pela técnica pode ser explicado pelas suas várias aplicações, não apenas no melhoramento genético, através da multiplicação de indivíduos superiores, mas também na propagação de indivíduos transgênicos, na preservação de espécies ameaçadas de extinção e também na biomedicina, através da possibilidade de produção de tecidos e órgãos, além das aplicações no campo de pesquisa básica.

Os componentes celulares necessários para a produção de um clone através da TN são: o núcleo doador e o citoplasma receptor, que possui capacidade de reprogramar a célula doadora, ou seja, permite que uma célula adulta seja reprogramada a um estágio indiferenciado, tornando-a capaz de originar todos os tecidos de um novo organismo e sustentar a vida embrionária e fetal.

O nascimento de produtos vivos e saudáveis através da TN prova a viabilidade da técnica, mas a sua eficiência ainda é baixa comparada à produção *in vitro* de embriões, tornando-a alvo de diversos estudos e pesquisas que visam o seu aperfeiçoamento.

O objetivo desse trabalho é fazer uma revisão de literatura sobre a clonagem por transferência nuclear, abordando o seu histórico, as etapas do procedimento e as possíveis causas da sua baixa eficiência.

2 Revisão de Literatura

2.1 Clonagem

A clonagem traduz um grande avanço na biotecnologia animal e permite a obtenção de cópias genéticas nucleares, que podem ter variações epigenéticas, citoplasmáticas e fenotípicas. Tem como principais objetivos a produção de animais de padrões genéticos superiores, manter características desejáveis nos rebanhos, preservar animais em via de extinção, produzir animais transgênicos, o estudo da interação núcleo-citoplasma na reprogramação celular e a produção de células ou tecidos que possam ser usados em diferentes tipos de terapias (ARNOLD et *al.*, 2002; SMITH & MURPHY, 2004; BORDIGNON, 2008).

A técnica de transferência nuclear (TN) está fundamentada nos princípios da equivalência nuclear, que é a conservação do genoma durante a diferenciação celular, e da plasticidade celular, propriedade que permite que a célula seja reprogramada a um estágio celular indiferenciado (SMITH & MURPHY, 2004). A TN envolve, basicamente, as seguintes etapas: obtenção de células doadoras de núcleo, obtenção de ovócitos receptores, remoção da cromatina (enucleação), sincronização do ciclo celular entre célula doadora e citoplasto, introdução do núcleo doador no ovócito receptor, ativação do ovócito reconstruído, cultivo *in vitro* e inovulação dos embriões (SARAIVA, 2010).

Embora várias espécies já tenham sido clonadas com sucesso, sugerindo boas perspectivas, o processo de clonagem é relativamente complexo e ainda não é considerado eficiente devido às baixas taxas de gestação e altas perdas gestacionais, sendo observado apenas 6 a 8% de fetos viáveis ao nascimento (MIGLINO, 2004; PANARACE et *al.*, 2007; KOHAN-GHADR et *al.*, 2008).

2.2 Histórico da transferência nuclear

A Transferência nuclear foi primeiramente proposta por Spemann (1938) apud PEREIRA & FREITAS (2009) com o objetivo de conhecer o papel do material genético na diferenciação celular, entretanto, o primeiro experimento realizado com sucesso aconteceu em 1951, quando pesquisadores da

Filadélfia enuclearam ovócitos de rã e os fundiram com células embrionárias no estágio de blástula. Foram reconstruídos no total 197 embriões, dos quais 63 chegaram ao estágio de blástula e a maioria destes gastrulou normalmente e formou embriões completos. (BRIGGS & KING, 1951; PEREIRA & FREITAS, 2009).

Depois dos experimentos de Briggs e King a transferência de células para ovócitos enucleados foi bastante aplicada em outras espécies de anfíbios, especialmente em *Xenopus laevis* (GORDON, 1974 *apud* ILLMENSEE & HOPPE, 1981).

Em 1981 a técnica de TN teve seu primeiro sucesso realizado com mamíferos, quando os pesquisadores Ilmensee e Hoppe anunciaram o nascimento de três camundongos clonados utilizando células de embriões como núcleos doadores. Mcgrath & Solter (1984) *apud* DE MELLO (2003) repetiram os experimentos de Ilmensee e Hope (1981) *apud* DE MELLO (2003) com núcleos de embriões em estágios mais avançados, porém não obtiveram sucesso, o que sugeriu que os experimentos de clonagem em mamíferos ainda estavam distantes do completo entendimento (DE MELLO, 2003).

Em 1986 surgiram os primeiros resultados animadores com a técnica em mamíferos, quando o dinamarquês Willadsen (1986) *apud* STICE & ROBL, (1988) utilizou ovócitos de ovelhas maturados *in vivo* e núcleos de embriões de 8 a 16 células, obtendo o nascimento de três cordeiros. Vários pesquisadores obtiveram sucesso com o método de Willadsen (1986) *apud* STICE & ROBL, (1988), obtendo o nascimento de clones bovinos (ROBL *et al.*, 1987), suínos (PRATHER *et al.*, 1989) e leporinos (STICE & ROBL, 1988).

Outro avanço decisivo para a clonagem em mamíferos foi obtido em 1989, quando Smith e Wilmut demonstraram que mesmo núcleos provenientes de células do botão embrionário de embriões no estágio de blastocisto mantinham o potencial para reiniciar o desenvolvimento embrionário. A utilização dessas células como doadoras de núcleo garantiria uma fonte ilimitada de células para a produção de clones. Posteriormente os estudos de Campbell *et al.*, (2007) mostraram que núcleos derivados de linhagens celulares embrionárias tinham capacidade para sustentar o desenvolvimento a termo. Como as células ficavam bastante tempo em cultura e havia modificações morfológicas significantes nas mesmas, esses resultados

sugeriam que mesmo células que estivessem completamente diferenciadas poderiam ser utilizadas na TN (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Em 1997 a utilização de células diferenciadas adultas na produção de um clone teve seu primeiro sucesso em um ovino que foi chamado de Dolly e a sua clonagem foi feita a partir de uma célula proveniente da glândula mamária de um animal de seis anos. O fato de um cordeiro ter sido derivado de uma célula adulta confirma que a diferenciação das células até chegarem à idade adulta não é um processo irreversível (WILMUT et al., 1997).

O sucesso da clonagem da ovelha Dolly demonstrou que era possível produzir uma cópia geneticamente idêntica de um mamífero a partir de uma célula somática diferenciada (ZATZ, 2004) e abriu espaço para a clonagem de outras espécies, como bovinos (CIBELLI et al., 1998), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), caprinos (BAGUISI et al., 1999), suínos (BETTHAUSER et al., 2000), felinos (SHIN et al., 2002), equídeos (GAMBINI et al., 2012) e caninos (LEE et al., 2005). Segundo Niemann e Lucas-Hahn (2012) a TN de células somáticas já havia sido realizada com sucesso em 16 espécies até o ano de 2011.

Do ponto de vista da produção animal, nos dias de hoje a clonagem está restrita apenas a rebanhos de elite e animais que possuam características especiais e a comercialização dos clones teve um importante passo com a divulgação de um relatório elaborado pelo Food and Drug Administration (FDA) que constatou depois de diversos estudos que o consumo de produtos derivados de clones bovinos, como carne e leite, não oferece risco à saúde humana (HEYMAN et al., 2007; MEIRELLES et al., 2007; RUDENKO & MATHESON, 2007).

Quanto às populações e subpopulações em risco de extinção, a TN pode ser útil para a restauração de espécies, associada a outras técnicas, como a inseminação artificial e a fecundação *in vitro*. Essas técnicas devem ser utilizadas para garantir a variabilidade genética em uma população. Quando não estiverem disponíveis ovócitos da mesma espécie que os animais doadores do material genético, pode ser realizada a clonagem interespecífica, que já teve sucesso ao utilizar-se células de búfalos (*Bubalus bubalis*) em ovócitos de vacas (*Bos indicus*) (LU et al., 2005; GÓMEZ et al., 2006).

2.2.1 A clonagem de bovinos no Brasil

O primeiro clone bovino latino-americano foi obtido no Brasil, no dia 17 de março de 2001, pela equipe da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Recursos Genéticos e Biotecnologia. Na ocasião, nasceu a bezerra Vitória, da raça Simental, que foi clonada a partir da transferência do núcleo de uma célula embrionária pluripotente para citoplasmas de ovócitos pré-ativados, em que a enucleação foi feita em telófase II (RUMPF, 2001 *apud* RODRIGUES & RODRIGUES, 2009; SOUZA et al., 2000, *apud* NEVES et al., 2010).

No dia 27 de abril de 2002, em Monte Mor – São Paulo, nasceu o bezerro que foi chamado de Marcolino da USP, cujo embrião foi reconstruído a partir de um fibroblasto fetal (célula diferenciada jovem) de um feto bovino sem raça definida (DE MELLO, 2003).

O primeiro clone brasileiro conseguido a partir de célula diferenciada adulta nasceu em julho de 2002, em Jaboticabal – SP e foi chamada de Penta. Em dezembro de 2003 nasceu uma bezerra nelore chamada de Bella da USP, também clonada a partir de uma célula diferenciada adulta (VISINTIN, 2008).

Em 2003 nasceu Lenda, uma 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. A bezerra nasceu no Centro experimental Sucupira, pertencente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (IGUMA et al., 2003, *apud* NEVES, 2010).

O primeiro clone do clone da América Latina também foi produzido pela Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia e foi chamada de Vitoriosa. Seu nascimento aconteceu em fevereiro de 2004 e a célula doadora de núcleo foi retirada da orelha da vaca Vitória (NEVES, 2010).

Desde março de 2005 são produzidos clones em uma rotina permanente na Vitrogen, empresa referência em biotecnologias da reprodução animal, em parceria com a USP Pirassununga (RODRIGUES & RODRIGUES, 2009).

A Geneal, em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinha investindo na clonagem desde 2006, e após a legalização do registro de animais clonados junto às Associações de Criadores, devido à homologação do regulamento do Serviço de Registro Genealógico

das Raças Zebuínas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em maio de 2009, vem oferecendo essa inovação ao mercado (GENEAL, 2014).

2.3 Objetivos da transferência nuclear

A obtenção de clones pode ter finalidade reprodutiva ou terapêutica. Na clonagem reprodutiva o objetivo é produzir um animal geneticamente idêntico ao doador do patrimônio genético, que sob o ponto de vista zootécnico é interessante para gerar indivíduos com perfil de excelência e alta produtividade ou com características favoráveis para o rebanho (EDWARDS *et al.*, 2003). Também pode ser utilizada na reprodução de espécies em risco de extinção (LANZA *et al.*, 2000) ou na obtenção de animais geneticamente modificados, que podem ser utilizados como biorreatores ou doadores de órgãos para xenotransplantação (BAERTSCHIGER & BUHLER, 2008).

Animais transgênicos podem ser utilizados como modelo para o estudo de doenças humanas, sendo designados a expressar genotipicamente ou fenotipicamente tais doenças. Para esses estudos os suínos e ovinos são mais utilizados, pois se assemelham mais aos humanos fisiologicamente e pela anatomia de seus órgãos (VAJTA & GJERRIS, 2006).

Os biorreatores são animais que excretam em suas secreções, como o leite, biofármacos ou bioprodutos, sendo úteis para a produção em massa de proteínas terapêuticas humanas (FU *et al.*, 2008).

A xenotransplantação consiste no transplante de um órgão de uma espécie não humana para humanos, buscando reduzir o déficit de órgãos no mundo (MELO *et al.*, 2007). A utilização de animais transgênicos nessa técnica tem como objetivo reduzir a incidência de rejeições de curto a longo prazo (SILVA, 2013).

Quando a finalidade é terapêutica, o resultado da técnica é a geração de tecidos ou órgãos que possam ser utilizados em bioengenharia tecidual ou na medicina regenerativa. Ela se baseia na produção de células tronco embrionárias pluripotentes que serão manipuladas a fim de se diferenciar nos mais diversos tecidos e órgãos, podendo servir para o tratamento de diversas doenças tanto em seres humanos quanto em animais (ZATZ, 2004). Esses resultados são possíveis graças ao conhecimento das interações núcleo-

citoplasma na reprogramação celular, obtido em estudos sobre a transferência nuclear. (PEREIRA & FREITAS, 2009).

2.4 Técnica de transferência nuclear

O desenvolvimento da clonagem através da transferência nuclear permite a produção de um número ilimitado de animais geneticamente idênticos, o que a torna uma poderosa ferramenta biotecnológica (DE MELLO, 2003).

A produção de ruminantes por TN envolve várias etapas, as quais influenciam diretamente no seu resultado final. Essa técnica pode ser utilizada para clonar animais adultos e jovens e sua viabilidade é comprovada por nascimentos de produtos vivos e saudáveis, porém a sua eficiência ainda é baixa comparada à produção *in vitro* de embriões, o que torna a técnica alvo de muitas pesquisas e estudos visando seu aperfeiçoamento (PEREIRA & FREITAS, 2009; SILVA, 2013).

Resumidamente, as etapas da TN são: enucleação do ovócito recipiente, preparação e transferência das células doadoras, fusão dos dois componentes, ativação do complexo reconstruído, cultivo temporário dos embriões reconstruídos e transferência para a receptora ou armazenagem em nitrogênio líquido (NIEMANN *et al.*, 2008).

Os ovócitos receptores podem ser recuperados de ovários de animais abatidos, sendo maturados *in vitro* ou colhidos por aspiração transvaginal de animais vivos. Já as células doadoras de núcleo podem ser embrionárias, fetais ou de animais adultos (KEEFER *et al.*, 2002).

A fonte de células doadoras de núcleo é um dos fatores que devem ser melhorados para que a reconstrução embrionária tenha mais sucesso, pois quanto menos diferenciadas forem essas células, mais facilmente serão reprogramadas pelo citoplasma receptor (SILVA, 2013). Para o aumento da eficiência da clonagem é essencial que sejam produzidas ou selecionadas populações celulares que apresentem a propriedade intrínseca de serem mais facilmente reprogramadas por esse citoplasma (SOLTER, 2000).

Atualmente, o grande entrave da técnica de TN é a ocorrência da reprogramação epigenética incompleta do núcleo das células somáticas doadoras, que deve ser reprogramado pelo ovócito enucleado através da

desmetilação desse núcleo até que ele chegue a um estado de pluripotência, ou seja, capaz de gerar qualquer tipo celular (PLASS & SOLOWAY, 2002).

2.4.1 Preparação de citoplasmas receptores

A qualidade e fonte do citoplasma receptor, chamado de citoplasto, são fatores importantes para o sucesso da TN. Vários estudos foram desenvolvidos para avaliar o estágio nuclear adequado dessa célula receptora para seu uso em programas de clonagem por transferência nuclear (PEREIRA & FREITAS, 2009). Segundo Niemann & Lucas-Hahn (2012), os ovócitos em estágio de metáfase II (M-II) apresentam melhores resultados para a produção de embriões clonados viáveis de mamíferos.

O citoplasto possui capacidade de alterar a programação de células adultas, levando-as a um estado indiferenciado que as torna capazes de darem origem a todos os tecidos de um novo organismo, podendo sustentar a vida embrionária e fetal (SILVA, 2013).

Os citoplasmas que receberão o núcleo das células doadoras podem ser maturados até o estágio de M-II *in vivo* (WILLADSEN, 1986, *apud* MELLO, 2003) ou *in vitro* (PRATHER et al., 1987), sendo que a utilização de células maturadas *in vitro* permite a obtenção com maior rapidez e menor custo de um grande número de ovócitos oriundos de ovários colhidos em abatedouros (ROBL, 1999; WELLS et al., 1997), além de possibilitar maior controle dos estágios de maturação. Os ovócitos que serão maturados *in vitro* também podem ser colhidos *in vivo* por meio de aspiração folicular de ovários superestimulados (BORDIGNON et al., 1997; KEEFER et al., 2002). Em relação aos ovócitos maturados *in vivo* têm sido demonstrados alguns fatores que interferem negativamente sobre a sua qualidade, como a idade da doadora e o protocolo de superestimulação ovariana (CAMPBELL et al., 2007).

Para espécies que possuem baixa disponibilidade de ovócitos o método proposto é a utilização de citoplastos receptores de outras espécies. Os resultados obtidos usando essa técnica sugerem que esses citoplastos se tornam competentes para receber esses núcleos (LOI et al., 2010). Lu et al. (2005) utilizaram células de búfalos (*Bubalus bubalis*) como doadoras em ovócitos de vacas (*Bos indicus*) e chegaram a uma taxa de blastocisto de 13,3%. Na mesma pesquisa foram utilizadas células bovinas (*Bos indicus*)

como doadoras em ovócitos de búfalas (*Bubalus bubalis*) e a taxa de blastocisto alcançada foi de 4,5%.

Para que seja feita a reconstrução do embrião através da técnica de transferência nuclear é necessária a remoção dos cromossomos (enucleação) do ovócito receptor, que deve ser feita após sua separação das células do *cumulus* e seleção criteriosa. Para que as células do *cumulus* sejam retiradas, os ovócitos são colocados em uma solução de hialuronidase (na concentração de 1mg/ml) e depois são passados diversas vezes através de uma pipeta fina ou colocados em um tubo e vortexados durante 3 a 5 minutos (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Os ovócitos selecionados, além de terem qualidade morfológica, devem apresentar o primeiro corpúsculo polar, que é um indicador de que este está no estágio de M-II, além de servir como ponto de referência para a localização da cromatina a ser removida (BORDIGNON & SMITH, 2002).

A enucleação pode ser feita química ou fisicamente, sendo que fisicamente é removida a placa metafásica juntamente com o corpúsculo polar, utilizando-se micromanipuladores e micropipetas ou através da bissecção dos ovócitos, na qual a metade que contém a placa metafásica será descartada. A perda citoplasmática no primeiro método varia de 5 a 50%, enquanto no segundo a perda é de 50% (WESTHUSIN et al., 1995; PEURA et al., 1998). Foram relatadas quedas nas taxas de blastocistos clonados quando os ovócitos utilizados haviam perdido muito volume citoplasmático na enucleação (ZAKHARTCHENKO et al., 1997).

Para que os ovócitos tenham maior elasticidade durante a microcirurgia esse procedimento é feito na presença de citocalasina, um desestabilizador reversível dos filamentos de actina (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Para confirmar a remoção do material nuclear, avalia-se a porção removida presente na pipeta de aspiração, que é marcada com Hoechst 33342, um corante específico de DNA que apresenta uma fluorescência em azul quando exposto a luz ultravioleta (SMITH, 1993; CHESNÉ, 2006 apud PEREIRA & FREITAS, 2009).

A enucleação através da bissecção dos ovócitos é chamada de enucleação manual, ou “handmade cloning” e tem como vantagem a simplificação do protocolo e redução de custos, já que não existe a

necessidade de uso de micromanipuladores (VAJTA et al., 2003). A técnica consiste em promover a digestão da zona pelúcida dos ovócitos maturados e em seguida enucleá-los manualmente com o auxílio de microlâminas. As interações entre citoplastos e núcleos doadores ocorrem pela exposição de tais componentes à fitohemaglutinina (VAJTA, 2007).

Na enucleação física também é retirado o citoplasma que fica ao redor da placa metafásica. Esse citoplasma contém RNAm, proteínas e percursores moleculares essenciais ao desenvolvimento embrionário inicial até a ativação do genoma embrionário (Li et al., 2004). Como alternativa pode ser feita a enucleação química, que causa mínima diminuição do volume citoplasmático e do conteúdo proteico e molecular (RUSSEL et al., 2005). Para esse tipo de enucleação várias substâncias têm sido utilizadas, como o etoposídeo, a colchicina, a demecolcina e a actinomicina D (KARNIKOVA et al., 1998; BAGUISI & OVERSTRÖM, 2000; GASPARRINI et al., 2003; IBÁÑEZ et al., 2003; MOURA, 2007). Contudo, citoplastos preparados quimicamente não produzem bom desenvolvimento embrionário e tem baixas taxas de clivagem quando comparados aos métodos de enucleação física (CAMPBELL et al., 2005).

2.4.2 Seleção e cultivo de células doadoras de núcleo

A origem do núcleo doador tem efeitos importantes sobre o desenvolvimento dos embriões reconstruídos, em vista disso numerosas pesquisas foram desenvolvidas evidenciando que células somáticas de diferentes tecidos e idades podem ser utilizadas com sucesso na TN. (CHESNÉ, 2006 *apud* PEREIRA & FREITAS, 2009). Células da glândula mamária, células musculares, fibroblastos de pele de orelha, células do epitélio do oviduto, células do *cumulus oophorus*, células gonadais fetais, fibroblastos fetais, fibroblastos da mucosa oral, células de Sertoli e células neurais já foram utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de TN (ZHOU et al., 2007) e a preparação dessas células varia em função do tipo de célula utilizada (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Estudos comparativos mostraram diferenças significativas na capacidade de linhagens celulares diferentes produzirem um desenvolvimento

embrionário, sendo que núcleos de células menos diferenciadas suportam melhor o desenvolvimento completo, comparadas com células totalmente diferenciadas (HOCHEDLIINGER & JAENISH, 2002).

A clonagem utilizando células-tronco embrionárias é significativamente mais eficiente do que utilizando células adultas (JAENISCH et al., 2002) e acredita-se que as células fetais têm menor quantidade de mutações e maior habilidade proliferativa do que células somáticas adultas (MIYOSHI et al., 2003).

Os fibroblastos de pele são muito utilizados na rotina, principalmente pela facilidade de obtenção do tecido para cultivo celular primário, alta capacidade mitótica e resistência ao processo de criopreservação, porém seu grau de diferenciação é muito avançado, o que prejudica a reprogramação realizada pelo ovócito. Para facilitar o processo de reprogramação podem-se utilizar as células do *cumulus*, que são menos diferenciadas (HEYMAN et al., 2002).

Segundo Silva (2013) é possível isolar, cultivar e criopreservar com eficiência células do fluido amniótico, da geléia de Wharton e do tecido adiposo de bovinos vivos sem prejudicá-los, sendo uma opção para recuperar células para a reclonagem. Essas células foram capazes de produzir embriões TN com eficiência superior a outros tipos celulares citados na literatura.

As células doadoras de núcleo podem ser utilizadas logo após a sua coleta do animal doador (GALLI et al., 1999) ou após um período de cultivo (KUBOTA et al., 2000) antes ou depois da criopreservação, mas o cultivo prolongado dessas células pode resultar em alterações que reduzem a eficiência da técnica (CAMPBELL et al., 2007). Segundo Suteevun et al. (2006) as modificações da cromatina e alterações epigenéticas estão entre os principais fatores determinantes para o sucesso da TN.

Estudos realizados em bovinos, ovinos e caprinos mostraram que células no estágio G₀ do ciclo celular tem competência para desenvolver embriões reconstruídos (WELLS et al., 1997; KATO et al., 2000; KEEFER et al., 2002; TIBARY et al., 2005).

Quando células que estão em cultivo são utilizadas como fonte de núcleo deve-se verificar se estão confluentes por no mínimo dois dias antes do

procedimento, o que indica que elas encontram-se no estágio G_0 do ciclo celular. Os tipos celulares são desagregados pela ação da tripsina e logo colocados na placa que será levada ao micromanipulador para as etapas subsequentes (SILVA, 2013).

2.4.3 Reconstrução, fusão e ativação

Depois que o material genético é removido do ovócito deve-se transferir o novo núcleo para dentro dele através da microinjeção pelo mesmo orifício da enucleação, inserindo uma única célula no espaço perivitelino (SILVA, 2013). Após essa inserção, deve-se fundir a membrana plasmática do ovócito receptor com o núcleo da célula doadora, o que pode acontecer através de descargas elétricas (eletrofusão), vírus Sendai inativado, polietilenoglicol ou lipossomas (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Após a introdução do novo material genético, é necessário estimular o início do desenvolvimento dos ovócitos através de um processo chamado de ativação, etapa que também é decisiva para o sucesso da TN, pois tem um importante efeito sobre a remodelagem dos núcleos transplantados e, conseqüentemente, sobre o desenvolvimento dos embriões reconstruídos (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Em condições normais esse processo é feito pelo espermatozoide no momento da fecundação, fornecendo estímulo para a retomada da meiose e início do desenvolvimento embrionário através de oscilações intracelulares do íon cálcio. O bloqueio da meiose no estágio de M-II é mantido pelo complexo de proteínas MPF (fator promotor da meiose), que ativa as proteínas responsáveis pela condensação da cromatina e manutenção dos ovócitos em M-II (PRATHER *et al.*, 1999; BORDIGNON & SMITH, 2002).

A eletrofusão é utilizada na maioria das espécies e leva à fusão das células através de um pulso de corrente alternada que tem o intuito de alinhar as membranas a serem fundidas em posição paralela aos eletrodos e um pulso de corrente direta para induzir a formação de poros nas membranas. Além de induzir a fusão do núcleo da célula doadora com o citoplasma receptor, o estímulo elétrico promove uma importante liberação de cálcio intracelular que dá início ao processo de ativação (HEYMAN, 2005; BORDIGNON & SMITH,

2008). Esse pulso elétrico deve ser feito em meio de baixa condutância elétrica para evitar a produção e dispersão de calor. As soluções mais utilizadas são a solução de Manitol (0,3 M de manitol e 0,1mM de MgSO₄ e 0,05 mM de CaCl₂) ou o meio de Zimmerman (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Os parâmetros usados para a eletrofusão como a duração, intensidade e o número de pulsos podem variar de acordo com o equipamento utilizado, o tipo de célula a ser utilizado e a espécie a ser utilizada. Em geral, quando a intensidade elétrica aplicada se aproxima do limite suportado pelas células sem que ocorra lise da membrana, os índices de fusão são mais elevados (BORDIGNON & SMITH, 2002).

Uma outra alternativa para a reconstrução embrionária é a injeção intracitoplasmática da célula intacta ou do núcleo isolado, técnica semelhante à injeção intracitoplasmática de gametas (YAMAZAKI, 2006).

A ativação dos complexos reconstruídos pode ser alcançada por pulsos elétricos curtos ou uma exposição rápida a substâncias químicas como a ionomicina, o 6-Deimethylamino-purine (6-DMAP), o etanol, o cálcio ionóforo, o estrôncio e o cicloheximide, que regulam o influxo de cálcio para esses complexos. Esses tratamentos podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto, o que resulta em melhores resultados (OZIL, 1990; PRESICCE & YANG, 1994; SUSKO-PARRISH et al., 1994; SOLOY et al., 1997; LIU et al., 1998; WAKAYAMA et al., 1998; YAMAZAKI et al., 2005; NIEMANN & LUCAS-HAHN, 2012).

A ativação da célula reconstruída é a etapa que precisa de mais aperfeiçoamento na técnica de TN. Vários trabalhos têm investigado as mudanças intracelulares causadas pelos espermatozoides durante a fecundação, buscando reproduzir essas alterações em sistemas artificiais. Quando esse processo é ineficiente ou não fisiológico, os níveis de MPF são restabelecidos e conseqüentemente o recrutamento do RNAm, a formação do pronúcleo, a síntese de DNA e a clivagem não ocorrem, podendo também ocorrer falhas no desenvolvimento embrionário mesmo após a implantação (ROBL, 1999; MÉO et al., 2004; YAMAZAKI, 2006; BORDIGNON & SMITH, 2008).

Após a reconstrução da célula embrionária e sua ativação tem-se adotado basicamente as mesmas técnicas de cultivo utilizadas para embriões

produzidos *in vitro* (PIV). O método de cultivo e o estágio de desenvolvimento no qual os novos embriões serão transferidos para as receptoras variam de acordo com a espécie (YAMAZAKI et al., 2006).

2.4.4 Reprogramação epigenética

O sucesso da TN depende da reprogramação epigenética, que é o processo que o núcleo doador deve sofrer para se tornar totipotente (HIIRAGI & SOLTER, 2005 *apud* SILVA, 2013). Essa reprogramação consiste em anular o padrão de expressão de uma célula diferenciada para que um novo padrão de expressão gênica embrionário seja estabelecido, possibilitando que ocorra o desenvolvimento embrionário e fetal (NIEMANN & LUCAS-HAHN, 2012). Para isso, o núcleo transferido deve suprimir os genes associados à diferenciação que foram transcritos na célula doadora original e ativar os genes importantes para o desenvolvimento embrionário inicial (JAENISCH et al., 2002).

A reprogramação inadequada do núcleo após a TN é apontada como a principal razão para a falha no desenvolvimento dos clones (JAENISCH et al., 2002) e por isso a prevenção de erros epigenéticos tem sido sugerida como uma maneira de melhorar a taxa de sucesso na clonagem animal (WANG et al., 2011).

2.5 Baixa eficiência na transferência nuclear

A eficiência da clonagem depende de um grande número de fatores relacionados com a técnica, mas principalmente com os parâmetros biológicos relacionados à interação do ciclo celular da célula doadora de núcleo e do citoplasma receptor, o procedimento de ativação artificial ou as condições de cultivo *in vitro* dos embriões reconstruídos (HEYMAN, 2005).

De acordo com as células doadoras e a técnica usada, dados na literatura indicam que em bovinos embriões reconstruídos são capazes de se desenvolver *in vitro* até o estágio de blastocisto em uma taxa que fica entre 20% e 60%, estando próxima à taxa de blastocisto de embriões produzidos após fertilização *in vitro* (HEYMAN, 2005).

Embora vários trabalhos já tenham conseguido produzir descendentes clonados através da TN, sua taxa de sucesso ainda é baixa. Nos trabalhos de Heyman et al. (2002) cerca de 0 a 5% dos embriões transferidos resultaram em

um desenvolvimento a termo. Isso ocorre porque os blastocistos são aparentemente normais, mas o desenvolvimento pós implantacional é frequentemente impedido, fazendo com que esses embriões apresentem reduzidas taxas de prenhez e significativas taxas de aborto (HEYMAN et al., 2002; PEREIRA & FREITAS, 2009).

Diversas anomalias têm sido constatadas durante a gestação e após o nascimento de animais clonados por TN, como placentação anormal, cardiopatias, hidroalantóide, deficiência imunológica, disfunção renal, alterações no metabolismo energético e hipertensão pulmonar (YOUNG et al., 1998; HEYMAN, 2005; CAMPBELL et al., 2007).

As alterações placentárias comumente observadas são a deficiência do desenvolvimento vascular placentário, demora na implantação, formação de número reduzido de placentoma e placentomegalia, que geram deficiência na funcionalidade da placenta. Essas alterações são responsáveis pela morte de aproximadamente 82% dos bovinos clonados entre o 30º e o 90º dia de gestação (MIGLINO, 2004; ARNOLD et al., 2008; BORDIGNON & SMITH, 2008; BAUERSACHS et al., 2009; KOHAN-GHADR et al., 2008).

A inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantoide em decorrência da falta ou ineficiência de vascularização, a rejeição imune e as alterações nos placentoma são apontados como causadores das perdas iniciais em gestações de clones (HILL et al., 2000).

O acúmulo de fluido no alantoide é chamado de hidroalantóide e promove o aumento dos placentomas e do tamanho fetal. Estudos indicam que 27% das gestações de clones obtidos por TN após 120 dias desenvolvem hidroalantóide (OBACK & WELLS, 2003). Já alterações como o aumento da espessura do cordão umbilical e membranas placentárias edematosas são descritas nos diferentes estágios da gestação (POGLIANI, 2010).

A taxa de neonatos viáveis é baixa, com média de 6 a 8%, podendo variar entre 0 e 12% (KEEFER, 2008; MIGLINO, 2004; OBACK, 2008; PANARACE et al., 2007).

Um problema recorrente é o elevado peso ao nascimento das crias, que é chamado de síndrome da cria gigante, ou LOS (Large Offspring Syndrome). Nesses casos se observa aumento do tamanho fetal, aumento da miogênese fetal e disfunção da atividade pulmonar. Além disso, são verificadas anomalias

no desenvolvimento da placenta e redução as taxas de gestação (YOUNG et *al.*, 1998). De acordo com Heyman et *al.* (2007), 13,3% dos bezerros clones são afetados por essa síndrome, que pode estar relacionada a alterações nos padrões epigenéticos associados com a cromatina embrionária durante a pré-implantação, o que resulta em mudanças na expressão de genes iniciadores e não iniciadores, que são perturbados pelo uso dessas biotécnicas (REIK & WALTER, 2001; REIK et *al.*, 2003; RIZOS et *al.*, 2003; WRENZYCKI et *al.*, 1998).

3 Considerações Finais

O notável progresso da transferência nuclear nos últimos anos gerou um grande impacto na comunidade acadêmica e também no setor produtivo. A transferência nuclear de células somáticas já demonstrou sucesso em várias espécies, comprovando a capacidade do citoplasma receptor de reprogramar células adultas a um estado indiferenciado, mas apesar de ter alcançado êxito, a TN ainda necessita de melhorias, principalmente em relação às alterações epigenéticas que ocorrem de forma errônea e comprometem o desenvolvimento dos produtos clonados.

Vários estudos e adaptações ainda precisam ser feitos para que sejam alcançados melhores resultados e se obtenham mais animais viáveis através dessa biotecnologia e para que sejam encontradas alternativas que visem simplificar os protocolos experimentais e reduzir os custos da utilização da técnica.

4 Referências Bibliográficas

ARNOLD, D. R.; Fortier AL, Lefebvre R, Miglino MA, Pfarrer C, Smith LC. Placental Insufficiencies in Cloned Animals – A Workshop Report. **Placenta**, v.22, 2008.

ARNOLD, D. R.; Bordignon, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C.; Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trofoblasto differentiation in bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.66, p.642-650, 2002.

BAERTSCHIGER, Reto M.; BUHLER, Leo H. Xenotransplantation literature update January–February, 2008. **Xenotransplantation**, v. 15, n. 3, p. 200-204, 2008.

BAGUISI, A.; Behboodi, E; Melican, DT; Pollock, JS; Destrempe, MM; Cammuso, C; Williams, JL; Nims, SD; Porter, CA; Midura, P; Palacios, MJ; Ayres, SL; Denniston, RS; Hayes, ML; Ziomek, CA; Meade, HM; Godke, RA; Gavin, WG; Overström, EW; Echelard, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.

BAGUISI, A.; OVERSTROM, E. W. Cloning/Nuclear Transfer-induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 209-209, 2000.

BAUERSACHS, S., Ulbrich, S. E., Zakhartchenko, V., Minten, M., Reichenbach, M., Reichenbach, H. D., ... & Wolf, E. (2009). The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(14), 5681-5686.

BETTHAUSER, J.; Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., ... & Bishop, M. Production of cloned pigs from in vitro systems. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1055-1059, 2000.

BORDIGNON, V.; Morin, N., Durocher, J., Bousquet, D., & Smith, L. C. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 291-298, 1997.

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

BORDIGNON V, SMITH LC. Clonagem animal por transferência nuclear. In: Gonçalves PB D, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.347-364.

BORDIGNON V, SMITH LC. Clonagem animal por transferência nuclear. In: Gonçalves PB D, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.347-364.

BRIGGS, Robert; KING, Thomas J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 38, n. 5, p. 455-463, 1952.

CAMPBELL, K. H. S.; Alberio, R., Choi, I., Fisher, P., Kelly, R. D. W., Lee, J. H., & Maalouf, W. Cloning: eight years after Dolly. **Reproduction in domestic animals**, v. 40, n. 4, p. 256-268, 2005.

CAMPBELL, K. H. S.; Fisher, P., Chen, W. C., Choi, I., Kelly, R. D. W., Lee, J. H., & Xhu, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68, p. S214-S231, 2007.

CIBELLI, Jose B. Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., ... & Robl, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, n. 5367, p. 1256-1258, 1998.

DE MELLO, Marco Roberto Bourg. **Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

EDWARDS, J. Lannett Schrick, F. N., McCracken, M. D., Van Amstel, S. R., Hopkins, F. M., Welborn, M. G., & Davies, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 2, p. 113-123, 2003.

FU, Jing et al. Effects of donor cells on *in vitro* development of cloned bovine embryos. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, n. 5, p. 273-278, 2008.

GALLI, Cesare et al. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, v. 1, n. 3, p. 161-170, 1999.

GAMBINI, A.; A., Jarazo, J., Olivera, R., & Salamone, D. F. Equine cloning: in vitro and in vivo development of aggregated embryos. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 1, p. 15, 2012.

GASPARRINI, B. Gao, S., Ainslie, A., Fletcher, J., McGarry, M., Ritchie, W. A., ... & De Sousa, P. A. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1259-1266, 2003.

GENEAL. **Clonagem**. Disponível em <<http://www.geneticaanimal.com.br/?pages=clonagem>>. Acessado em 19/04/2014 às 12:42:34.

GÓMEZ, M.C., Pope, C.E., Dresser, B.L. Nuclear transfer in cats and its application. **Theriogenology** 66, 72-81, 2006.

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, n. 1, p. 6-13, 2002.

HEYMAN, Yvan. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 353-362, 2005.

HEYMAN, Y. Chavatte-Palmer, P., Berthelot, V., Fromentin, G., Hocquette, J. F., Martignat, L., & Renard, J. P. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 134-141, 2007.

HILL, J. R. Burghardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T., ... & Westhusin, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1787-1794, 2000.

HOCHEDLINGER, Konrad; JAENISCH, Rudolf. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1035-1038, 2002.

IBÁÑEZ, Elena; ALBERTINI, David F.; OVERSTRÖM, Eric W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1249-1258, 2003.

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

JAENISCH, Rudolf et al. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. **Cloning & Stem Cells**, v. 4, n. 4, p. 389-396, 2002.

KÁRNÍKOVÁ, Lenka et al. Chemically enucleated mouse oocytes: ultrastructure and kinetics of histone H1 kinase activity. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, n. 6, p. 643-651, 1998.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 120, n. 2, p. 231-237, 2000.

KEEFER, C. L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). **Theriogenology**, v.69, p.48-54, 2008.

KEEFER, C. L. et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 199-203, 2002.

KOHAN-GHADR, H. R. et al. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. **Theriogenology**, v.15, n.2, p. 218–230, 2008.

KUBOTA, Chikara et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 3, p. 990-995, 2000.

LANZA, Robert P. et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning**, v. 2, n. 2, p. 79-90, 2000.

LEE, Byeong Chun et al. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 641-641, 2005.

LI, Guang-Peng et al. Development, chromosomal composition, and cell allocation of bovine cloned blastocyst derived from chemically assisted enucleation and cultured in conditioned media. **Molecular reproduction and development**, v. 68, n. 2, p. 189-197, 2004.

LIU, Lin; JU, Jyh-Cherng; YANG, Xiangzhong. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. **Molecular reproduction and development**, v. 49, n. 3, p. 298-307, 1998.

LOI, P.; MODLINSKI, J. A.; PTAK, G. Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 217-228, 2011.

LU, Fenghua et al. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1309-1319, 2005.

MEIRELLES, F. V. et al. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.382-390, 2007.

MELO, Eduardo O. et al. Animal transgenesis: state of the art and applications. **Journal of applied genetics**, v. 48, n. 1, p. 47-61, 2007.

MÉO, Simone Cristina; LEAL, Cláudia Lima Verde; GARCIA, Joaquim Mansano. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal reproduction science**, v. 81, n. 1, p. 35-46, 2004.

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

MIYOSHI, Kazuchika et al. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1079-1086, 2003.

MOURA, Marcelo Tigre. Utilização da actinomicina D como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à transferência nuclear. 2007. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

NEVES, Jairo Pereira; MIRANDA, Karina Leite; TORTORELLA, Rodrigo Dorneles. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. sespecial, 2010.

NIEMANN, Heiner et al. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 151-163, 2008.

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s5, p. 2-10, 2012.

OBACK, B. Climbing mount efficiency: Small steps, not giant leaps towards higher cloning success in farm animals. **Reproduction Domestic Animal**. v.43, p.407-416, 2008.

OBACK, B.; WELLS, D. Cloning cattle. **Cloning Stem Cells**, v.5, p.243-256, 2003.

OZIL, Jean Pierre. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. **Development**, v. 109, n. 1, p. 117-127, 1990.

PANARACE, M. et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*, v.67, p.142-151, 2007.

PLASS, Christoph; SOLOWAY, Paul D. DNA methylation, imprinting and cancer. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, n. 1, 2002.

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.

PEURA, T. T.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. **Molecular reproduction and development**, v. 50, n. 2, p. 185-191, 1998.

POGLIANI, F. C. Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem. 2010. 107p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PRATHER, Randall S. et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of reproduction**, v. 37, n. 4, p. 859-866, 1987.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of reproduction**, v. 41, n. 3, p. 414-418, 1989.

PRATHER, R. S.; TAO, T.; MACHATY, Z. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 487-498, 1999.

PRESICCE, Giorgio A.; YANG, Xiangzhong. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. **Molecular reproduction and development**, v. 37, n. 1, p. 61-68, 1994.

REIK, W; SANTOS, F; DEAN, W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. **Theriogenology**, v.59, p.21-32, 2003.

REIK, W; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nat Rev Genet**, v.2, p.21-32, 2001.

RIZOS, D; GUTIERREZ-ADAN, A; PEREZ-GARNELO, S; DELAFUENTE, J; BOLAND, MP; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocytos development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol Reprod**, v.68, p.236-243, 2003.

ROBL, J. M. et al. Nuclear transplantation in bovine embryos. **Journal of animal science**, v. 64, n. 2, p. 642-647, 1987.

ROBL, James M. Development and application of technology for large scale cloning of cattle. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 499-508, 1999.

RODRIGUES, José Luiz; DE ÁVILA RODRIGUES, Berenice. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 428-436, 2009.

RUDENKO, Larisa; MATHESON, John C. The US FDA and animal cloning: risk and regulatory approach. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 198-206, 2007.

RUSSELL, D. Fischer et al. Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 72, n. 2, p. 161-170, 2005.

SARAIVA, Naiara Zoccal. Citoplastos receptores produzidos por diferentes técnicas de enucleação na transferência nuclear em bovinos. **Embrapa Pecuária Sudeste-Teses/dissertações (ALICE)**, 2011.

SHIN, Taeyoung et al. Cell biology: a cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 859-859, 2002.

SILVA, Carolina Gonzales da. 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 – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 83p., 2013.

SMITH, L. C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 1, p. 39-44, 1993.

SMITH, L.C.; MURPHY, B.D. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. **Cloning Stem Cells**, Larchmont New York, v.6, p.126-132, 2004.

SOLOY, Eva et al. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 1, p. 27-35, 1997.

SOLTER, Davor. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature reviews genetics**, v. 1, n. 3, p. 199-207, 2000.

STICE, Steven L.; ROBL, James M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 3, p. 657-664, 1988.

SUSKO-PARRISH, J. L. et al. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Developmental biology**, v. 166, n. 2, p. 729-739, 1994.

SUTEEVUN, T. et al. Epigenetic characteristics of cloned and in vitro-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Journal of animal science**, v. 84, n. 8, p. 2065-2071, 2006.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 618-638, 2005.

VAJTA, Gábor et al. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 2, p. 571-578, 2003.

VAJTA, Gábor; GJERRIS, Mickey. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. **Animal reproduction science**, v. 92, n. 3, p. 211-230, 2006.

VAJTA, Gabor. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer?. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 250-253, 2007.

VISINTIN, José Antonio; MELLO, Marco Roberto Bourg; PECORA, Marcella. BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL Clonagem e transgenia animal, 2008.

WANG, Y. S. et al. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 819-825, 2011.

WAKAYAMA, Teruhiko et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369-374, 1998.

WELLS, David N. et al. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo-and in vitro-matured cytoplasts. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 2, p. 385-393, 1997.

WESTHUSIN, M. E. et al. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 243-252, 1996.

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.

WRENZYCKI, C; HERRMANN, D; CANRWATH, JW; NIEMANN, H. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. **J Reprod Fertil**, v.112, p.387-398, 1998.

YAMAZAKI, Yukiko et al. Adult mice cloned from migrating primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11361-11366, 2005.

YAMAZAKI, Yukiko et al. Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 2, p. 180-188, 2006.

YOUNG, Lorraine E.; SINCLAIR, Kevin D.; WILMUT, Ian. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155-163, 1998.

ZAKHARTCHENKO, V. et al. Enucleation of bovine oocytes with minimal cytoplasmic volume: effect on development of nuclear transfer embryos. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 238-238, 1997.

ZATZ, Mayana. Clonagem e células-tronco. **Estudos avançados**, v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004.

ZHOU, H.; LIU, C.; WANG, W. Heterospecific Nuclear-transferred Embryos Derived from Equine Fibroblast Cells and Enucleated Bovine Oocytes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 3, p. 243-247, 2007.

5 Relatório Final de Estágio Obrigatório

O estágio foi realizado no período de 26 de fevereiro de 2014 a 30 de maio de 2014, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília-DF.

Uma parte das atividades acompanhadas foi realizada no laboratório de Reprodução Animal (LRA1) do prédio da Biotecnologia (PBI) do CENARGEN e a outra parte no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (CES).

5.1 Descrição das atividades desenvolvidas

Durante o período de estágio foi acompanhada uma rotina que envolvia projetos de pesquisa com produção *in vitro* de embriões, vitrificação de embriões, transferência nuclear, coleta e congelamento de sêmen bovino, avaliação da dinâmica folicular de vacas, palpação e diagnóstico de gestação em vacas, manipulação hormonal em vacas, diagnóstico de gestação em ovelhas e avaliação da cinética de espermatozoides, entre outras (Tabela 1).

Todos os processos foram acompanhados por mestrandos e doutorandos designados pelos supervisores de estágio, que explicavam as atividades e seus objetivos.

Por se tratar de projetos de pesquisas que ainda não foram concluídos e nem publicados, algumas metodologias e resultados não foram divulgados.

A maior parte do estágio foi voltada para a produção *in vitro* de embriões, por isso nela será dada mais atenção na descrição.

QUADRO 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio obrigatório na Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	Nº
Lavagem e esterilização de materiais	*
Produção de pipetas para manipulação de ovócitos e embriões	200
Aspiração folicular de ovários de abatedouro	500
Produção <i>in vitro</i> de embriões	8
Vitrificação de embriões	3
Coleta e congelamento de sêmen bovino	10

Avaliação da dinâmica folicular de vacas	15
Palpação em vacas	50
Manipulação hormonal em vacas	20
Diagnóstico de gestação em vacas	10
Diagnóstico de gestação em ovelhas	15
Avaliação da cinética de espermatozoides	5
Acompanhamento da técnica de transferência nuclear	5
Participação do “Journal Club”	11

*Realizada diariamente

5.1.1 Aspiração de ovócitos em ovários de abatedouros

Os ovários eram coletados no abatedouro e colocados em recipiente de vidro estéril com solução salina a 0,9% suplementada com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e aquecida a 32-35°C. O transporte dos ovários era feito em caixa térmica com água a 32-35°C. A temperatura era mantida durante o transporte dos ovários, sendo checada antes, durante e depois do transporte.

Ao chegar no laboratório os ovários eram lavados com solução salina estéril, previamente aquecida a 32-35°C e o recipiente com eles era mantido no banho-maria durante a aspiração dos folículos, que era realizada no fluxo laminar.

Para evitar que a viabilidade dos ovócitos diminua, os ovócitos aspirados devem ser colocados em maturação no período de 4 a 6 horas após a coleta dos ovários no abatedouro.

A aspiração folicular era feita com seringa de 10ml e agulha 40x12 e o conteúdo era colocado em tubos de 15ml.

Antes de começar e durante a aspiração é importante que o fluxo laminar e o banho-maria estejam ligados com pelo menos duas horas de antecedência, tudo seja limpo com etanol 70%, os tubos de coleta (15 ml) estejam no banho-maria, sejam usadas luvas e o papel utilizado para secar os ovários esteja autoclavado.

Após a punção o ideal é aguardar 10 minutos para que os ovócitos sedimentem no fundo do tubo. Passado esse tempo o pellet é retirado com o

auxílio de uma pipeta de Pausteur e colocado em uma placa de Petri grande, contendo meio de lavagem.

Os ovócitos são rastreados e todos que são encontrados são passados para outra placa de Petri (pequena) contendo de 2 a 3 ml de meio de lavagem, onde são selecionados quanto à qualidade, através da avaliação da uniformidade do citoplasma e quantidade e aparência das células do *cumulus*.

5.1.2 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões se divide em três etapas: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* dos embriões.

5.1.2.1 Maturação *in vitro*

Após a seleção, os ovócitos de graus I e II eram separados e passados para uma placa com gotas de 200µl de meio de maturação para a lavagem dos mesmos. Após o banho os ovócitos eram transferidos para as placas de MIV, contendo gotas de 200µl de meio de maturação (com capacidade para 25 a 30 ovócitos cada gota) cobertas por óleo mineral, previamente preparadas e estabilizadas.

Os ovócitos permanecem por 20 a 22 horas no meio de maturação a 39°C, com 5% de CO₂ em ar.

Esse processo é necessário porque no momento da aspiração os ovócitos ainda estão imaturos, precisando desse tempo de maturação para tornarem-se aptos a serem fecundados.

5.1.2.2 Fecundação *in vitro*

Para a FIV é necessário que um ovócito maturado (no estágio de metáfase II) e um espermatozoide se encontrem em um meio de cultura, temperatura e atmosfera adequadas, que irão simular as condições de fecundação *in vivo*.

Após as 22-24 horas de maturação, os ovócitos são lavados em meio de fecundação final e passados para as gotas de FIV (previamente preparadas e estabilizadas) enquanto é feita a preparação do sêmen.

A preparação do sêmen, no laboratório, é feita utilizando-se a técnica do gradiente de Percoll (45% e 90%), que pode ser preparado no mesmo dia do

uso, desde que tenha tempo suficiente para estabilização (no mínimo duas horas).

O sêmen é descongelado em água a 37°C por 30-60 segundos e é retirada uma fração para análise de motilidade e vigor. O sêmen é colocado sobre a coluna de Percoll e centrifugado a 9000rpm por 5 min. O pellet formado é retirado e ressuspensionado em meio CAP e centrifugado novamente a 9000rpm/5min. Após a retirada do sobrenadante é acrescentado em torno de 100µl de meio FEC.

Para calcular a concentração, em um micro-tubo Eppendorf,[®] são colocados 95µl de água e acrescentados 5µl de sêmen ressuspensionado em FEC final (1:20) para contagem na câmara de Neubauer.

Para calcular a dose inseminante final de 1×10^6 /ml de espermatozoides vivos, avaliamos a motilidade e vigor do sêmen e acrescentamos o volume de sêmen até completar 100% de espermatozoides móveis. Com a dose calculada, o sêmen é adicionado às gotas de FEC com os ovócitos maturados, que será incubada por um período de 12 a 18 horas, em estufa a 39°C, com 5% de CO₂.

5.1.2.3 Cultivo *in vitro* de embriões

Após 18 horas de co-cultivo de ovócitos e espermatozoides, os prováveis zigotos são retirados do meio FIV, levemente pipetados e lavados em 2 ou 3 gotas do meio SOF, para a retirada dos espermatozoides e transferidos para as gotas de cultivo embrionário. As células do *cumulus* remanescentes não são retiradas. Em D2 (48 horas após a FIV) os zigotos são avaliados quanto à clivagem, já em D6, D7 e D8 será avaliada a taxa de blastocistos (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto expandido). Por fim, esses embriões podem ser transferidos para o útero de receptoras ou criopreservados.

5.2 Considerações finais sobre o estágio

Realizar o estágio em um grande centro de pesquisa foi de grande valia, pois foi possível acompanhar diversos projetos de pesquisa com biotecnologia da reprodução, além da familiarização com a rotina laboratorial e de campo.

Vários dos procedimentos acompanhados já haviam sido explicados e demonstrados em sala de aula e o período de estágio foi uma oportunidade para a prática e maior familiarização com tais procedimentos, desde aqueles realizados a campo como a palpação de vacas e diagnósticos de gestação como procedimentos laboratoriais como a produção *in vitro* de embriões e a técnica de transferência nuclear.

Além do grande conhecimento prático adquirido o estágio também agregou muito conhecimento científico através do estudo e das explicações que eram oferecidas pelos mestrandos, doutorandos e pesquisadores, além do “Journal Club”, uma reunião semanal na qual eram discutidos artigos científicos sobre diversas biotécnicas da reprodução.