MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO

**Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto
como fonte doadora de núcleo**

São Paulo
2003

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO

**Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto
como fonte doadora de núcleo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo
2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1323
FMVZ

Mello, Marco Roberto Bourg de
Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como
fonte doadora de núcleo / Marco Roberto Bourg de Mello. – São
Paulo : M. R. B. Mello, 2003.
82 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução
Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

1. Embrião animal. 2. Clonagem animal. 3. Núcleo celular
(transferência). 4. Fibroblastos. 5. Bovinos. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MELLO, Marco Roberto Bourg de

Título: Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho e tudo o que
ele representa na minha vida ao
Prof. José Antônio Visintin

AGRADECIMENTOS

- ✓ Aos meus pais, Sônia e Fernando, pelo exemplo, pelo carinho, pelo amor e segurança que me transmitem. Pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida. Amo vocês!
- ✓ À Sandra Fernandez e à Cuca pela cumplicidade por todo este difícil período e pelo apoio incondicional. Sempre entendendo e aceitando minhas constantes variações de humor, minhas angústias, minhas depressões, meus períodos de estresse e, principalmente, minha ausência. Serei eternamente agradecido à cada palavra e a cada gesto de apoio, carinho e incentivo.
- ✓ Aos meus irmãos Solange, Fernando, Paulo, Luis, Caio e Ciça por me darem segurança, por me fazerem feliz e por morarem dentro do meu coração.
- ✓ À Universidade de São Paulo (USP), pela formação, pela sua beleza e por me proporcionar anos tão maravilhosos e inesquecíveis.
- ✓ Ao Médico Veterinário e grande amigo Marcelo Silva Padilha (Capi) pela valiosa e inestimável contribuição nas transferências dos embriões e na assistência às receptoras.
- ✓ À Heloísa Vasconcellos do Amaral Caetano pela valiosa e importante colaboração em todas as fases deste projeto.
- ✓ À Fazenda Panorama (Monte Mor - SP) em nome do Sr. Fernando pelo fornecimento e manutenção das receptoras. Aos tratadores Cícero e Overati pela boa vontade e presteza.
- ✓ Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia (UNESP - Araçatuba - SP), aos Médicos Veterinários Sérgio e Gustavo e a LINKGEN pela análise das regiões microssatélites.

- ✓ Ao Prof. Dr. Xiangzhong Yang da Universidade de Connecticut - EUA pela oportunidade, hospitalidade e pelos ensinamentos durante estádiorrealizado em seu laboratório.
- ✓ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo 99/07377-3).
- ✓ À Mariana pelas correções, sugestões e por todo empenho despendido na confecção desta Tese.
- ✓ Aos colegas de laboratório Alessandra, Aníbal, Camila, Camilla, Cláudia, Cris, Heloísa, Ranato (Lampréia), Marcella, Mariana, Mayra, Renata e Viviane pela colaboração no projeto, pelas palavras de apoio e incentivo, pela torcida e pela ótima convivência.
- ✓ À Julia pelos vários momentos inesquecíveis de imensa alegria que me proporcionou.
- ✓ Ao Departamento de Reprodução Animal representado por seus Professores, Funcionários, Alunos de Pós-Graduação e Estagiários.
- ✓ Aos Frigoríficos Mantiqueira (São José dos Campos - SP) e Rajá (Piracicaba - SP) pelas centenas de ovários cedidos para este experimento.
- ✓ Ao amigo Marcílio pela ajuda na análise estatística.
- ✓ À Zani pela revisão final desta Tese.
- ✓ Aos amigos da 57ª Turma: Basso (Presidente), Cassiano, Coruja, Fredão, Dido, Jegão, Pavan (Quilha), Limão e James.

"Quando nada parece ajudar, eu vou e olho o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes sem que nem uma só rachadura apareça. No entanto, na centésima primeira martelada, a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que a conseguiu, mas todas as outras que vieram antes". (Jacob Riis)

RESUMO

MELLO, M. R. B. **Clonagem em bovinos**: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo. [Bovine cloning: fetal and adult fibroblasts as nuclei donor source]. 2003. 82f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos reconstruídos com oócitos enucleados em Metáfase II e núcleos de células somáticas (fibroblastos) fetais e adultas. Para tanto, oócitos de ovários colhidos em matadouro foram maturados *in vitro* por 17 horas e enucleados pela remoção do primeiro corpúsculo polar (CP) e da região do oolema contendo a placa metafásica. Como núcleo doador, foram utilizados fibroblastos de orelha de vaca da raça Nelore e de feto colhido em abatedouro. Para a reconstrução dos embriões, cada célula doadora de núcleo, após indução à G0, foi inserida sob a zona pelúcida de cada oócito enucleado e o complexo citoplasma receptor - núcleo doador (CCN) fundido e ativado por eletrofusão (2 pulsos de 4 KV/cm durante 20µs). Após ativação elétrica, cada CCN foi incubado em solução de ciclohexemide (10µg/ml) e citocalasina D (2,5µg/ml) por 1 hora e, em seguida, em solução de ciclohexemide (10µg/ml) por mais 4 horas. Os embriões reconstruídos e ativados, assim como os fecundados *in vitro* (controle), foram co-cultivados em monocamada de células da granulosa e TCM 199 acrescido de 10% de SFB por 7-9 dias. Após o co-cultivo por 7-9 dias, parte dos embriões (controle e reconstruídos) foi fixada e corada para determinação do número de células e parte transferida para receptoras. Um total de 668 embriões foram reconstruídos com célula fetal e 569 com fibroblasto adulto. Após eletrofusão, 212 embriões reconstruídos com célula fetal e 181 com célula adulta fundiram e 32 (15,1%) e 30 (16,6%) atingiram o estágio de blastocisto,

respectivamente. O número médio de células dos blastocistos foi 129,3, 101,3 e 114,3, respectivamente, para célula fetal, adulta e embriões FIV (controle), não havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Após a transferência de 18 blastocistos de célula fetal e 21 de célula adulta, as taxas de prenhez aos 90 dias foram 16,7% (3) e 19% (4), respectivamente, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($P < 0,05$). A primeira prenhez com célula fetal deu origem a um bezerro saudável, aos 290 dias, pesando 34kg. Uma das receptoras morreu aos 229 dias de gestação em consequência de hidroalantóide e outra abortou aos 252 dias. As prenhez de embriões reconstruídos com célula adulta ainda estão em andamento. Estes resultados indicam que fibroblastos fetal e adulto podem ser usados como doadores de núcleo com semelhantes taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Embrião animal. Clonagem animal. Núcleo Celular (Transferência).

Fibroblastos. Bovinos.

ABSTRACT

MELLO, M. R. B. **Bovine cloning**: fetal and adult fibroblasts as nuclei donor source. [Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo]. 2003. 82f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* viability of bovine nuclear transferred embryos from metaphase II oocytes and fetal and adult fibroblasts. Oocytes from ovaries collected at slaughterhouse were matured *in vitro* for 17 hours and enucleated after aspiration of first polar body (PB) and small volume of cytoplasm containing metaphase plate. Fibroblasts from Nelore cow and foetus collected at slaughterhouse were used as nuclei donor. In Nuclear Transfer, each nuclei donor cell, after serum starvation, was inserted under the zona pellucida of the each enucleated oocyte and the enucleated oocyte- nuclei donor cell complexes were electrofused and activated (2 pulses of 4KV/cm for 20µs). After electrical activation, the couplets were incubated in TCM199 plus 10% FCS supplemented with cycloheximide (10µg/ml) and cytochalasin D (2.5µg/ml) for 1 hour and cycloheximide alone for further 4 hours. The activated reconstructed embryos, as well as IVF embryos (control group), were co-cultured with granulosa cells in TCM 199 + 10% FCS for 7–9 days. After co-cultured, part of embryos (control and reconstructed) was fixed and the number of cells counted and part was transferred into recipients. A total of 668 couplets were reconstructed from fetal and 569 from adult fibroblasts. After electrofusion, 212 (fetal cells) and 181 (adult cells) embryos got fused and 32 (15.1%) and 30 (16.6%) reached blastocyst stage, respectively. The blastocyst cell number means were 129.3, 101.3 and 114.3, respectively, for fetal, adult and IVF (control) embryos. There was no significant difference ($P<0.05$) in the number of cells of blastocysts among the groups. After transferring 18 (fetal cells) and 21

(adult cells) blastocysts, pregnancy rates at day 90 were 16.7% (3) and 19% (4), respectively. There was no significant difference ($P < 0.05$) between pregnancy rates. The first pregnancy from fetal cells delivered a healthy male calf at day 290, weighting 34kg. One of the remaining recipients died with hydrallantois at day 229 and the other aborted at day 252. The pregnancies of adult cells reconstructed embryos are still in course. These results indicated that fetal and adult fibroblasts could be used as nuclei donor, with similar rates of *in vitro* and *in vivo* developments.

Key-words: Embryos. Cloning. Nuclear Transfer. Fibroblasts. Bovine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Porcentagem de oócitos em cada estágio do ciclo celular após diferentes períodos de maturação.	50
Tabela 2-Eficiência da maturação e da enucleação de oócitos maturados <i>in vitro</i> para reconstrução com fibroblastos fetal e adulto.	51
Tabela 3-Desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e embriões controle (FIV).	52
Tabela 4-Taxas de prenhez após transferência de blastocistos reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e blastocistos fecundados <i>in vitro</i> (controle).	53
Tabela 5-Análise das regiões microssatélites de 11 <i>loci</i> das células doadoras de núcleo, dos bezerros (1, 2 e 3) e das receptoras (1, 2 e 3).	56
Tabela 6-Número de células dos blastocistos reconstruídos (TN) com fibroblastos fetal e adulto e fecundados <i>in vitro</i> (FIV).	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Oócitos bovinos corados com bisbenzêmid (Hoechst N° 33342) e avaliados sob luz epifluorescente: A - Oócito maduro classificado como adjacente (AD). B - Oócito maduro classificado como hemisfério oposto (HO).	37
Figura 2-Enucleação de oócitos bovinos: A – micropipeta perfurando a zona pelúcida próximo ao 1º corpúsculo polar. B - oócito com fenda (seta) na zona pelúcida.	39
Figura 3-A) Oócito bovino enucleado. B e C) Citoplasma com placa metafásica e o 1º CP (microscopia óptica e epifluorescente).	39
Figura 4-Reconstrução de oócito bovino com fibroblasto em G0.	42
Figura 5-Eletrofusão da célula doadora de núcleo (fibroblasto) com oócito enucleado: disposição dos embriões reconstruídos na câmara de eletrofusão.	43
Figura 6-Clone oriundo de células fetal com 1 (A), 4 (B) e 14 (C e D) meses de idade.	54
Figura 7-A) Útero com hidroalantóide. B) Feto clonado...	55

Figura 8-A) Clone abortado. B) Fenda mandibular (seta).....	55
---	----

Figura 9-Blastocistos (7 ^o dia do desenvolvimento) corados com Hoechst 33342 para determinação do número de células. A) reconstruído com fibroblasto fetal e B) fecundado <i>in vitro</i>	57
--	----

Quadro 1-Grupos experimentais de acordo com a fonte doadora de núcleo e o método de ativação	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AD = Adjacente

ANA = Anáfase

CCN = Complexo citoplasma receptor – núcleo doador

CdK = Ciclina dependente de quinase

CP = Corpúsculo Polar

CPC = Condensação prematura da cromatina

CIDR = Dispositivo intravaginal para controle do cio em bovinos

DC = “Direct current”

DMEM = “Dulbelcco’s Modified Eagle Media”

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EGFP = “enhanced green fluorescent protein”

FCS = “Fetal Calf Serum”

FIV = Fecundação *in vitro*

FSH = Hormônio folículo estimulante

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

G1 = Fase que antecede a síntese de DNA

G2 = Fase que antecede a mitose/meiose

HO = Hemisfério oposto

LCS = “Large calf syndrome”

LH = Hormônio Luteinizante

MI = Metáfase I

MII = Metáfase II

MH = Mesmo Hemisfério

MIV = Maturação *in vitro*

MPF = Fator promotor da fase M

OPU = “Ovum pick up”

PB = “Polar Body”

PBS = Solução tamponada de fosfato

RNA = Ácido Ribonucleico

S = Fase de síntese de DNA

SFB = Soro Fetal Bovino

TCM = “Tissue culture medium”

TE = Transferência de embriões

TEL = Telófase

TN = Transferência Nuclear

VG = Vesícula Germinativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Histórico da clonagem	23
2.2	Transferência Nuclear (TN)	25
2.2.1	Produção de citoplasmas receptores	25
2.2.2	Enucleação	26
2.2.3	Reconstrução, Fusão e Ativação	26
2.2.4	Reprogramação	27
2.2.5	Ciclo celular da célula doadora de núcleo e do citoplasma receptor	28
2.3	Manipulação genética das células doadoras de núcleo	31
3	OBJETIVOS	33
4	MATERIAL E MÉTODO	35
4.1	Colheita e maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	36
4.2	Avaliação de diferentes períodos de Maturação <i>in vitro</i>	37
4.3	Enucleação de oócitos em metáfase II (MII)	38
4.4	Células doadoras de núcleo	40
4.4.1	Isolamento e cultivo de fibroblasto fetal	40
4.4.2	Isolamento e cultivo de fibroblasto adulto	41
4.5	Reconstrução dos embriões	42
4.6	Fusão e Ativação	43
4.7	Produção <i>in vitro</i> de embriões (grupo Controle)	44
4.8	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões	45
4.9	Produção <i>in vivo</i> de embriões (grupo Controle)	45

4.10	Transferência de embriões.....	46
4.11	Contagem do número de células.....	46
4.12	Análise de regiões microssatélites.....	46
4.13	Análise estatística	48
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

A palavra CLONE deriva do grego *Klón* e significa broto de planta que, quando quebrado, pode se desenvolver como a planta-mãe. Foi criada para denominar indivíduos que se originam de outros por reprodução assexuada, bastante comum em vegetais. Para os microbiologistas, por exemplo, o termo clone se aplica à população de microorganismos geneticamente idênticos. Em mamíferos o processo de clonagem “natural” produz gêmeos idênticos. Isto se dá quando o embrião, nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, sofre uma divisão natural, originando dois ou mais indivíduos geneticamente iguais (gêmeos univitelinos). No entanto, a clonagem “natural” resulta em número limitado de cópias.

A produção de número ilimitado de cópias tornou-se possível com o desenvolvimento da técnica da Transferência Nuclear (TN) cujo princípio consiste na fusão de uma célula diplóide (embrionária, fetal ou adulta) com um oócito enucleado. A produção de animais geneticamente idênticos (clones) pela T.N. apresenta-se como poderosa ferramenta biotecnológica. O sucesso na utilização de células de cultura primária (fibroblastos, células da glândula mamária, células tronco, células do *cumulus oophorus*, etc) na produção de animais clonados com emprego da técnica de Transferência Nuclear poderá possibilitar a produção de animais geneticamente modificados, objetivando a produção de proteínas de interesse humano, de órgãos para xenotransplantes etc. A técnica de transferência nuclear que permite produzir animais a partir de células cultivadas, constitui alternativa mais eficiente para a produção de bovinos transgênicos em relação à metodologia clássica de injeção de DNA em pró-núcleo de zigotos. Este fato deve-se à capacidade de manipular milhares de células ao mesmo tempo, o que aumenta a possibilidade de modificações genéticas, como a deleção ou substituição de genes específicos, ou alterações no código genético responsáveis por doenças genéticas.

Experimentos envolvendo a técnica de Transferência Nuclear ainda possibilitam estudar aspectos básicos relacionados à ativação genômica, à reprogramação nuclear, à sincronização do ciclo celular, à interação núcleo-citoplasma, à herança citoplasmática materna (DNA mitocondrial), assim como produzir, em larga escala, indivíduos geneticamente idênticos (clones), permitindo a rápida difusão de material genético superior.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Clonagem

A Clonagem, originalmente, desenvolveu-se como método para estudar os mecanismos envolvidos na diferenciação celular (ROBL, 1999). Hans Spemann, um dos grandes biólogos experimentais do século XX, foi o pioneiro nos estudos sobre totipotência de células embrionárias. Em experimentos realizados em 1902, Spemann separou os blastômeros de embriões de 2 células de salamandra, dando origem a indivíduos adultos. Desta maneira, ficou evidenciada a manutenção da totipotência de blastômeros de embriões de salamandra. No entanto, apenas em 1951 foi realizado com sucesso o primeiro experimento com Transferência Nuclear (BRIGGS; KING, 1951). Pesquisadores da Filadélfia enuclearam oócitos de rã (*Rana pipens*) e os fundiram com células de embrião no estágio de blástula. Após a reconstrução de 197 embriões, 27 se desenvolveram até o estágio de girino (WILMUT; CAMPBELL; TUDGE, 2000).

Desde o clássico trabalho de Briggs e King (1951) em anfíbios, o método da Transferência Nuclear tem sido empregado na produção de indivíduos geneticamente idênticos (FULKA et al., 1998; PRATHER; TAO; MACHÁTY, 1999). Em mamíferos, o primeiro sucesso foi obtido em camundongos por Illmensee e Hoppe (1981). Estes autores anunciaram o nascimento de três camundongos clonados, produzidos pela técnica de Transferência Nuclear, utilizando células de embriões como núcleos doadores. No entanto, Mcgrath e Solter (1984) não foram bem sucedidos ao repetir os experimentos de Illmensee e Hoppe (1981) com núcleos de embriões em estádios mais avançados. Desta forma, os seguidos insucessos de Mcgrath e Solter (1984) em camundongos sugeriam que os experimentos de clonagem em mamíferos ainda estavam distantes do completo entendimento. O dinamarquês Willadsen (1986) foi o primeiro a conseguir resultados animadores com a

Transferência Nuclear. Utilizou oócitos de ovelhas maturados *in vivo* e obteve o nascimento de 3 cordeiros a partir de núcleos de embriões de 8 a 16 células. Vários pesquisadores, empregando o método de Willadsen (1986), utilizaram células embrionárias como doadoras de núcleo e obtiveram nascimento de clones de bovinos, suínos e leporinos (PRATHER; SIMS; FIRST, 1989; ROBL et al., 1987; STICE; ROBL, 1988). A clonagem empregando células diferenciadas adultas foi realizada com sucesso, pela primeira vez, em ovinos (WILMUT et al., 1997). Neste experimento, após a reconstrução de 277 embriões com células da glândula mamária, obteve-se o nascimento da ovelha Dolly. A grande repercussão gerada por este acontecimento foi decorrente da demonstração, pela primeira vez, de que era possível clonar um mamífero a partir de uma célula somática diferenciada. Após publicação de Wilmut et al. (1997), o sucesso da clonagem com células diferenciadas foi também alcançado em bovinos, murinos, caprinos, suínos, felinos e equídeos (BAGUISI et. al., 1999; KATO et al., 1998; ONISHI et al., 2000; SHIN et al., 2002; WAKAYAMA et al., 1998; WOODS et al., 2003)

No Brasil, foram conseguidos clones bovinos a partir de células embrionárias, fetais e adultas. No dia 17 de março de 2001, em Brasília, nasceu o primeiro clone a partir de célula embrionária, a Vitória. No dia 27 de abril de 2002, em Monte-Mor – SP, Fazenda Panorama, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada jovem, o Marcolino da USP (MELLO et al., 2003). Em julho de 2002, em Jaboticabal-SP, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada adulta, a Penta.

2.2 Transferência Nuclear (T.N.)

O procedimento para produção de indivíduos geneticamente idênticos em larga escala se baseia na técnica de Transferência Nuclear descrita por Willadsen (1986). Esta técnica compreende as seguintes etapas: produção de citoplasmas receptores, preparo das células doadoras de núcleo, reconstrução dos embriões, ativação e desenvolvimento *in vitro* dos embriões.

2.2.1 Produção de citoplasmas receptores

Os primeiros estudos de Transferência Nuclear em mamíferos relatam a utilização de zigotos em estágio pró-nuclear como fonte precursora de citoplasma receptor (MCGRATH; SOLTER, 1983; ROBL et al., 1987). No entanto, os resultados desses trabalhos demonstraram baixa taxa de desenvolvimento dos embriões reconstruídos. É reportada à Willadsen (1986) a utilização pioneira de oócitos maturados *in vivo* (Metáfase II) para produção de citoplasmas receptores. Prather et al. (1987) foram os primeiros a mostrar a possibilidade da utilização, com sucesso, de oócitos bovinos maturados *in vitro* como citoplasmas receptores. A importância deste trabalho está no fato de podermos obter com maior rapidez e menor custo, grande número de oócitos oriundos de ovários colhidos em abatedouro. A utilização de oócitos maturados *in vitro* ou *in vivo* para produção de citoplasmas receptores tem sido objeto de estudos (ROBL, 1999; WELLS et al., 1997).

2.2.2 Enucleação

O procedimento de Transferência Nuclear necessariamente envolve a remoção dos cromossomos (enucleação) do citoplasma receptor. A maioria dos trabalhos sobre Transferência Nuclear adota como método de eleição para enucleação, a aspiração da placa metafásica, utilizando-se micropipetas e micromanipulador (PEURA; LEWIS; TROUNSON, 1998). Outro método de enucleação é o da bisecção de oócitos, descartando-se a metade que contém a placa metafásica. No segundo método ocorre perda de 50% do citoplasma, enquanto que no primeiro essa perda varia de 5 a 50% (WESTHUSIN et al., 1996). Zakhartchenko et al. (1997) relataram diminuição na taxa de blastocistos clonados quando utilizaram oócitos que haviam perdido grande volume do citoplasma por ocasião da enucleação.

2.2.3 Reconstrução, Fusão e Ativação

Após a remoção do material genético do citoplasma receptor, a célula doadora de núcleo é colocada sob a membrana pelúcida do oócito enucleado e fusionada com estímulo elétrico. A eficiência da clonagem em bovinos é afetada por muitos fatores, sendo a fusão da célula doadora ao citoplasma receptor um dos mais importantes (GOTO et al., 1997). Segundo Goto et al. (1997) a fusão celular por estimulação elétrica resulta em baixas taxas de fusão (< 50%) quando são utilizadas células pequenas, uma vez que a superfície de contato é reduzida. Como método alternativo para Transferência Nuclear, pode-se injetar o núcleo da célula doadora diretamente no citoplasma receptor.

Robl (1999) considera a ativação do citoplasma reconstruído como a etapa que necessita de mais aperfeiçoamento no procedimento da Transferência Nuclear. Segundo o autor, vários trabalhos têm investigado as mudanças intracelulares provocadas pelo espermatozóide durante a fecundação na tentativa de reproduzir estas alterações em sistemas artificiais. Para estimular o início do desenvolvimento de oócitos logo após a introdução do novo material genético é necessário que se faça ativação do “complexo citoplasma receptor-núcleo doador”. Sob condições normais, o oócito é ativado pelo espermatozóide no momento da fecundação, fornecendo estímulo para a retomada da meiose e início do desenvolvimento embrionário. Este estímulo desencadeia aumento transitório da concentração de cálcio (PRATHER; TAO; MACHÁTY, 1999). A ativação dos CCNs pode ser induzida artificialmente por uma série de agentes físicos e químicos (LOI et al., 1998). Dentre estes destacam-se os estímulos elétricos, assim como os ionóforos (Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^{+}) e a solução de etanol a 7% (PRATHER; TAO; MACHÁTY, 1999). Wang et al. (1999) estudaram a utilização do cálcio ionóforo (A23187) na ativação de oócitos suínos. Após avaliarem o efeito de diferentes tempos (0; 0,5; 1; 2 e 5 minutos) de exposição ao cálcio, os autores observaram que 2 minutos de exposição em $50\mu\text{M}$ do agente proporcionou a maior taxa de ativação (74%).

2.2.4 Reprogramação

Após a reconstrução e a fusão da célula doadora com o citoplasma receptor, uma série de reações em cascata ocorre entre o núcleo e o citoplasma. O citoplasma de oócitos maduros promove a quebra da vesícula germinativa, a condensação da cromatina, o

deslocamento de proteínas citoplasmáticas para o núcleo e a reprogramação do genoma (ZAKHARTCHENKO et al., 1997). A observação do aumento de tamanho do núcleo doador, após fusão ao citoplasma receptor, em coelhos, suínos e bovinos, sugere certo grau de reprogramação do genoma (PRATHER; SIMS; FIRST, 1989; SMITH et al., 1994; STICE; ROBL, 1988). Com objetivo de estudar aspectos relacionados à reprogramação do genoma em embriões bovinos reconstruídos, Kanka et al. (1999) avaliaram mudanças morfológicas do envelope nuclear e da ultraestrutura dos nucléolos, comparando com as mudanças de embriões não micromanipulados. Os autores observaram que embriões reconstruídos a partir de citoplasmas ativados sofrem completa remodelação dos nucléolos, indicando preparo para síntese de RNA ribossômico e, portanto, reprogramação do genoma.

2.2.5 Ciclo celular da célula doadora de núcleo e do citoplasma receptor

O desenvolvimento de embriões após a Transferência Nuclear depende fundamentalmente da compatibilidade entre o núcleo doador e o citoplasma receptor (ZAKHARTCHENKO et al., 1997). Portanto, características do citoplasma receptor como seu estágio de desenvolvimento e sua posição no ciclo celular têm importância decisiva no sucesso da técnica.

Stice et al. (1998) destacam a importância do estágio do ciclo celular do oócito receptor na reprogramação do núcleo doador. Segundo os autores, para ovinos, oócitos ativados antes da fusão com o núcleo doador foram capazes de reprogramar o núcleo doador independentemente do seu estágio no ciclo celular.

O controle do ciclo celular, tanto na mitose quanto na meiose, é realizado bioquimicamente pelo fator promotor da fase M (“MPF–*M-phase promoting factor*”). O MPF é formado por dois grupos protéicos: as quinases dependentes das ciclinas ou Cdk e as ciclinas. Quando a forma ativa deste fator atinge elevadas concentrações citoplasmáticas, induz e coordena os eventos de divisão celular como a quebra do envelope nuclear e a condensação da cromatina. Portanto, com base nestas informações, os núcleos das células doadoras podem ser inseridos em dois distintos ambientes citoplasmáticos, ou seja, presença de i) MPF ativo e de ii) MPF inativo (QUEIROZ, 1998). Os núcleos transferidos para citoplasmas com altas concentrações de MPF sofrem imediata quebra do envelope nuclear e condensação prematura da cromatina (CPC). Neste caso o envelope nuclear é reorganizado e inicia-se a síntese de DNA, ocasionando, em alguns casos, poliploidia. Em contrapartida, núcleos transferidos para citoplasmas com MPF inativo não sofrem modificações estruturais (FULKA; FIRST; MORR, 1996).

O ciclo de divisão celular compreende duas fases: Interfase e fase M. A fase M é mais curta e corresponde à Mitose e a Citocinese. A fase mais longa (Interfase) é subdividida em G1, S e G2. Durante a fase S (S = síntese) ocorre replicação do DNA e nas fases G1 e G2 a célula cresce preparando-se para a divisão. Células em fase G1 ainda podem estacionar em estado quiescente denominado G0, no qual o ciclo de divisão celular é interrompido momentaneamente (ALBERTS et al., 1994).

Fulka et al. (1998) discutiram uma série de questões relacionadas ao uso de células somáticas como núcleo doador nos experimentos de clonagem. Os autores destacam a importância do estágio de desenvolvimento nuclear da célula doadora de núcleo.

Núcleos em estado quiescente (fase G0) assemelham-se às células espermáticas no momento da fecundação, sendo este fato importante para o estabelecimento da correta ploidia do embrião reconstruído. Já os núcleos em fase S ou G2 seriam impróprios para

reconstrução uma vez que ainda passariam pela replicação do DNA, tornando os embriões tetraplóides. Collas, Barnes e Robl (1992), em experimento com coelhos, obtiveram maior taxa de blastocistos utilizando núcleos em fase G1 do que em fase S (71% e 15%, respectivamente).

Tanto embriões produzidos *in vitro* quanto *in vivo* têm sido utilizados como fonte doadora de núcleos. Heyman et al. (1994), ao compararem a eficiência da transferência de núcleos utilizando blastômeros de mórulas bovinas produzidas *in vitro e in vivo*, não observaram diferença entre as fontes doadoras. Zakhartchenko et al. (1996) avaliaram diferentes estádios de desenvolvimento de embriões como doadores de núcleo. Após avaliarem embriões produzidos *in vitro e in vivo*, os autores concluíram que, para ambos os casos, o estágio de desenvolvimento do embrião doador de núcleos afeta a eficiência da Transferência Nuclear. O estágio de mórula com início da formação da blastocle proporcionou maior número de embriões clonados.

No clássico experimento que deu origem à ovelha Dolly, Wilmut et al. (1997) avaliaram a utilização de diferentes tipos celulares (epitélio mamário, fibroblasto fetal e células embrionárias) como doadores de núcleos após induzi-los à fase G0 pela redução da concentração de soro no meio de cultivo. Os autores obtiveram nascimentos com os três tipos celulares, sendo que os embriões reconstruídos com núcleo de fibroblastos fetais proporcionaram maiores taxas de nascimento (7,5% contra 3,4% do epitélio mamário e 5,6% da células embrionárias). Dolly foi o primeiro mamífero clonado a partir de uma célula derivada de tecido adulto (glândula mamária). Um ano após o experimento de Wilmut et al. (1997), Wakayama et al. (1998) mostraram que, para mamíferos, o núcleo de células somáticas adultas introduzidas no citoplasma de oócitos enucleados são capazes de suportar o completo desenvolvimento, produzindo descendentes viáveis. Neste experimento, Wakayama

et al. (1998) obtiveram camundongos clonados após a injeção de núcleo de células do *cumulus* em oócitos enucleados.

Zakhartchenko et al. (1999) avaliaram a eficiência de células germinativas fetais bovinas como fonte doadora de núcleos. Ao avaliarem células germinativas masculinas e femininas derivadas de fetos em diferentes fases de desenvolvimento (50 a 57; 65 a 76; 95 a 105 dias), os autores obtiveram maiores taxas de blastocisto com células retiradas de fetos mais novos (50 a 57 dias), independentemente do sexo. Neste experimento, Zakhartchenko et al. (1999) obtiveram nascimento de um bezerro após a transferência de 17 blastocistos. Verma et al. (2000) obtiveram blastocistos suínos após cultivo de embriões reconstruídos a partir de fibroblastos de feto. Os autores compararam os fibroblastos em diferentes estádios do ciclo celular (fase de crescimento ou de quiescência), não observando diferença significativa entre as taxas de desenvolvimento *in vitro*.

2.3 Manipulação genética das células doadoras de núcleo

A possibilidade de introdução de genes exógenos no genoma de células estabelecidas *in vitro* e a utilização destas como núcleos doadores na reconstrução embrionária pela Transferência Nuclear abrem nova perspectiva para produção de animais transgênicos. Diferentes linhagens de células bovinas, como por exemplo, embrionária (“stem-cell”) ou fibroblastos (fetal ou adulto) são isoladas e cultivadas, podendo um gene de interesse ser inserido nestas células juntamente com um gene de seleção (resistência a antibióticos). As células que expressam a construção gênica são selecionadas, cultivadas *in vitro* e utilizadas como fonte doadora de núcleos. As células transgênicas em cultivo podem

ainda ser facilmente criopreservadas, assegurando a conservação de material genético para reconstrução de embriões. Segundo Stice et al. (1998), a maior vantagem da técnica de Transferência Nuclear para produção de animais transgênicos, quando comparada à microinjeção em pró-núcleos, é a economia de tempo e custos. Uhm et al. (2000) demonstraram a expressão do gene EGFP (“enhanced green fluorescent protein”) em embriões suínos reconstruídos com fibroblasto fetal manipulado geneticamente. Após reconstruírem 188 embriões, 25 atingiram o estádio de blastocisto, sendo que todos emitiram fluorescência.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar a cinética da maturação nuclear de oócitos bovinos, visando detectar o melhor momento para enucleação.
2. Avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões reconstruídos pela técnica da Transferência Nuclear (TN) com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vitro*.
3. Avaliar as taxas de prenhez dos embriões reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vivo*.
4. Avaliar o número de células dos embriões reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vitro* (FIV) no estágio de blastocisto.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Colheita e maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Os ovários foram colhidos em abatedouros localizados em São José dos Campos - SP (130km de São Paulo – SP) e Piracicaba – SP (170km de São Paulo – SP). Após a colheita, os ovários foram lavados em solução fisiológica e transportados em recipiente térmico contendo solução fisiológica acrescida de antibióticos e aquecida a 30°C. No laboratório, 4 a 6 horas após o início do abate, os ovários foram lavados 2 vezes em solução fisiológica aquecida a 30°C sendo, em seguida, feita aspiração dos folículos com diâmetro entre 2 e 8mm com agulha de calibre 21G acoplada à seringa de 10ml. O líquido folicular foi depositado em tubo cônico de centrífuga de 10ml, permanecendo em repouso por 10 minutos. Após este período, o sedimento de cada tubo foi colocado em placa de petri (90mm) e diluído no próprio líquido folicular para recuperação dos oócitos. Apenas oócitos apresentando camada de células do *cumulus oophorus* espessa e compacta e citoplasma com granulações finas e homogêneas foram selecionados para maturação *in vitro* (MIV). Após seleção, os oócitos foram lavados três vezes em meio TCM 199 acrescido de hepes e 10% de soro fetal bovino e colocados para maturação *in vitro* em meio TCM 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, LH, FSH, 17 β estradiol, piruvato e antibiótico (Anexo 1). Os oócitos permaneceram por 16-24 horas em incubadora a 39°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Após este período, os oócitos foram divididos em dois grupos, sendo um destinado ao preparo de citoplasmas receptores (enucleação) e outro à fecundação *in vitro* para produção de embriões controle.

4.2 Avaliação de diferentes períodos de Maturação *in vitro*

Com o objetivo de otimizar o procedimento de enucleação, desenvolveu-se experimento para avaliar diferentes períodos de maturação *in vitro*, procurando estabelecer o melhor momento para a enucleação dos oócitos. Cinco grupos de 100 oócitos foram cultivados por 16, 18, 20, 22 e 24 horas, corados e avaliados quanto ao estágio de maturação em microscópio invertido equipado com luz epifluorescente. Os oócitos foram classificados em vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), anáfase (ANA), telófase (TEL) e metáfase II (MII). Os oócitos em metáfase II foram subdivididos em 3 grupos: adjacência (AD), quando a placa metafásica e o 1º corpúsculo polar estavam adjacentes (Figura 1A); mesmo hemisfério (MH), quando a placa metafásica e o 1º corpúsculo polar não estavam adjacentes, porém no mesmo hemisfério do oócito e hemisfério oposto (HO), quando o 1º corpúsculo polar e a placa metafásica encontravam-se em hemisférios opostos (Figura 1B).

Figura 1 - Oócitos bovinos corados com bisbenzêmidio (Hoechst N° 33342) e avaliados sob luz epifluorescente: A - Oócito maduro classificado como adjacente (AD).
B - Oócito maduro classificado como hemisfério oposto (HO)

4.3 Enucleação de oócitos em metáfase II (MII)

O método empregado para enucleação dos oócitos foi a descrita por Fuliang¹, (informação verbal). Após 17 horas do início da maturação *in vitro*, os oócitos em MII, destinados à produção de citoplasmas receptores, tiveram as células do *cumulus oophorus* removidas completamente. Para isto foram expostos à solução de hialuronidase (2mg/ml) por 10 minutos, sendo em seguida colocados em PBS acrescido de 20% de SFB e aspirados repetidamente em pipeta tão fina quanto o oócito até remoção completa das células. Após a remoção das células do *cumulus oophorus*, os oócitos contendo o 1º corpúsculo polar (1º CP) foram separados e incubados em microgotas (30µl) de solução de micromanipulação (Anexo 6) cobertas por óleo mineral. A enucleação dos oócitos foi realizada pela remoção do citoplasma adjacente ao primeiro corpúsculo polar em microscópio invertido (Zeiss) acoplado a 2 micromanipuladores (Narishige). Com auxílio de micropipeta extremamente fina (1 – 2 µm) foi realizado um corte na zona pelúcida bem próximo ao 1ºCP (Figuras 2A e 2B). Em seguida, o oócito foi pressionado com a micropipeta até a saída do 1ºCP e de parte do citoplasma (Figura 3A). O citoplasma retirado não ultrapassou 10% do total de citoplasma do oócito. Para confirmar a eficiência da enucleação o citoplasma removido foi corado por 15 minutos (5µg/ml de bisbenzêmidio – Hoechst 33342 – Anexo 7) e submetido à luz ultravioleta para visualização da placa metafásica e do 1ºCP (Figuras 3B e 3C).

¹ Informação verbal fornecida por Fuliang Du durante visita ao Transgenic Animal Facility, College of Agriculture and Natural Resources, University of Connecticut, Storrs - CT, EUA, 2001.

Figura 2 – Enucleação de oócitos bovinos: A - micropipeta perfurando a zona pelúcida próximo ao 1º corpúsculo polar. B - oócito com fenda (seta) na zona pelúcida

Figura 3 – A) Oócito bovino enucleado. B e C) Citoplasma com placa metafásica e o 1º CP (microscopia óptica e epifluorescente)

4.4 Células doadoras de núcleo

Para reconstrução dos embriões foram utilizados fibroblastos fetal e adulto.

4.4.1 Isolamento e cultivo de fibroblasto fetal

Para obtenção de fibroblasto fetal, foi utilizado feto bovino, sem raça definida, com aproximadamente 60 dias de idade, colhido em abatedouro localizado em São José dos Campos. Após decaptação do feto, fragmentos de pele foram removidos para cultivo primário em meio DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Media – Gibco®”) suplementado com 10% de SFB e gentamicina. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Os fibroblastos que se originaram desses fragmentos permaneceram em cultivo até alcançarem aproximadamente 90% de confluência. Após a confluência, os fibroblastos foram tripsinizados (tripsina 0,1% em PBS sem cálcio e magnésio) e replaqueados sucessivamente até atingirem a 3ª passagem, quando foram congelados em meio DMEM, suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfoxido (DMSO). Para utilização como células doadoras de núcleos, os fibroblastos foram descongelados e cultivados até atingir 90% de confluência. Para indução à fase G0, os fibroblastos permaneceram em meio com 0,5% de SFB por 3 –5 dias (carência de soro ou “*serum starvation*”), quando foram tripsinizados, lavados em meio de cultura e utilizados para reconstrução dos embriões.

4.4.2 Isolamento e cultivo de fibroblasto adulto

Para obtenção de fibroblasto adulto, foi retirado fragmento de orelha de vaca da raça Nelore, seguindo protocolo de Heyman² (informação verbal). O material colhido foi lavado 3 vezes em PBS com antibiótico e manipulado, sob estereomicroscópio em fluxo laminar, para remoção da cartilagem e dos pêlos. Após este procedimento, o fragmento foi cortado em pequenas frações de 2 a 3mm, que foram colocadas sob pressão no fundo de placa de Petri (35mm) e cobertas com 1ml de meio de cultura (DMEM suplementado com 10% de SFB e gentamicina). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade até que os fibroblastos proliferassem e migrassem das frações. Isto ocorreu aproximadamente após 7 dias de cultivo, quando foi adicionado 1ml do meio de cultura fresco em cada placa, tomando o cuidado para não descolar as frações do fundo da placa de Petri. Ao observar 40% de confluência, as frações foram retiradas cuidadosamente. Os fibroblastos permaneceram em cultivo até alcançarem aproximadamente 90% de confluência, quando foram tripsinizados (tripsina 0,1% em PBS sem cálcio e magnésio) e replaqueados sucessivamente até atingir a 3ª passagem, sendo congelados em meio contendo DMEM, suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfoxido (DMSO). Para utilização como células doadoras de núcleos, os fibroblastos foram descongelados e cultivados até atingir 90% de confluência. Para indução à fase G0, os fibroblastos permaneceram em meio com 0,5% de SFB por 3 – 5 dias (carência de soro ou “*serum starvation*”), quando foram tripsinizados, lavados em meio de cultura e utilizados para reconstrução dos embriões.

² Informação verbal fornecida por Ivan Heyman durante Workshop intitulado “Células Somáticas para Clonagem”, realizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal – SP, 2000.

4.5 Reconstrução dos embriões

Os oócitos enucleados e os fibroblastos carenciados foram transferidos para placa de micromanipulação (PBS suplementado com 20% SFB). Com auxílio de micropipeta, cada fibroblasto foicolocado sob a zona pelúcida de cada oócito enucleado, aproveitando-se a fenda produzida por ocasião da enucleação (Figura 4).

Figura 4 – Reconstrução de oócito bovino com fibroblasto em G0

Grupo - Célula doadora de núcleo	Método de fusão e ativação
I – Fibroblasto Adulto	Elétrico + Citocalasina + Ciclohexemide
II – Fibroblasto Fetal	Elétrico + Citocalasina + Ciclohexemide
III – CONTROLE (FIV)	Embriões fecundados <i>in vitro</i>
IV – CONTROLE (TE)	Embriões fecundados <i>in vivo</i>

Quadro 1 – Grupos experimentais de acordo com a fonte doadora de núcleo e o método de ativação

4.6 Fusão e Ativação

Imediatamente após a reconstrução, os complexos citoplasma receptor - núcleo doador (CCN) foram incubados por 5 minutos em PBS acrescido de 20% de SFB e mais 5 minutos em solução de Zimmerman (Anexo 10). Após este período, os CCNs, em grupos de 5, foram colocados e posicionados na câmara de eletrofusão (Microslide 0,5mm – P/N 450), preenchida com 1ml de Zimmerman, de maneira que o contato entre as membranas do oócito enucleado e da célula doadora estivesse paralelo aos eletrodos (Figura 5). Neste momento, os embriões reconstruídos foram submetidos a 2 pulsos elétricos de 4 KV/cm (corrente direta – DC) durante 20 μ s disparados pelo eletrofusor (“Eletro Cell Manipulator ECM 2001 – BTX”) que induzem a formação de poros nas membranas, resultando na fusão das células. A cada 2 grupos de 5 CCNs, foi adicionada nova solução de Zimmerman para evitar superaquecimento dos embriões.

Figura 5 – Eletrofusão da célula doadora de núcleo (fibroblasto) com oócito enucleado: disposição dos embriões reconstruídos na câmara de eletrofusão

Após a eletrofusão, os embriões reconstruídos foram colocados por 15 minutos em PBS acrescido de 20% de SFB, sendo em seguida, incubados por 1 hora em solução contendo 10µg/ml de ciclohexemide e 2,5µg/ml de citocalasina D (Solução Pós-fusão 1 – Anexo 8). Após este período, os embriões ficaram por mais 4 horas em solução contendo 10µg/ml de ciclohexemide (Solução Pós-fusão 2 – Anexo 9). A taxa de fusão foi avaliada quando os embriões passaram da solução 1 para a 2.

4.7 Produção *in vitro* de embriões (Grupo Controle)

Para produção de embriões controle (Grupo III), oócitos maturados *in vitro* por 24 horas foram incubados com espermatozóides previamente separados dos mortos pela técnica de gradiente percol e capacitados com heparina. Os oócitos (20 a 30) e os espermatozóides (1×10^6 células/ml) foram incubados em microgotas (100µl) de meio de FIV GOTA (Anexo 4) cobertas com óleo mineral permanecendo em estufa a 39°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade por 18 horas. Após este período, os presumíveis zigotos foram cultivados após a remoção mecânica das células do “*cumulus oophorus*” com auxílio de pipeta.

4.8 Cultivo *in vitro* de Embriões

Os embriões reconstruídos (Grupos I, II) e controle (Grupo III) foram co-cultivados em monocamada de células da granulosa no meio TCM 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino (Anexo 5), por 7 – 9 dias, em estufa a 39°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade, para avaliar as taxas de desenvolvimento embrionário. No 2º dia foi avaliada a taxa de clivagem e adicionado novo meio de cultivo (“*feeding*”). A partir do 7º dia, foi avaliada a taxa de blastocisto.

4.9 Produção *in vivo* de embriões (Grupo Controle)

Para produção *in vivo* de embriões controle (Grupo IV), foram utilizadas vacas da raça Nelore. Após avaliação ginecológica das doadoras, foi iniciado o tratamento superovulatório com implante intravaginal CIDR® (D0) e aplicação de 2,5 ml de Estrogin (Benzoato de Estradiol). No D5 iniciou-se a aplicação de 8 subdoses decrescentes de FSH (Pluset®) com aplicação de prostaglandina no D8. Foram realizadas 2 inseminações, uma com 6 e outra com 18 horas após o início dos sintomas de cio. No D17 foi realizada a colheita dos embriões pelo método não cirúrgico. Como controle, embriões classificados como excelente e bom (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998) foram transferidos à fresco para receptoras.

4.10 Transferência dos embriões

Sete a nove dias após o início do co-cultivo, parte dos embriões reconstruídos e controle (Grupo IV) que atingiram o estágio de blastocisto foi transferida pelo método não cirúrgico para receptoras sincronizadas. Trinta dias após a transferência, foi realizado o diagnóstico de gestação com auxílio de ultra-som.

4.11 Contagem do número de células

No 7º dia do co-cultivo à tarde, parte dos embriões reconstruídos e controle foi utilizada para contagem do número de células. Os blastocistos foram fixados entre lâmina e lamínula em solução de glicerol e corados em solução contendo 5µg/ml de bisbenzemide (Hoechst 33342 – Anexo 7). A contagem dos núcleos foi feita em microscópio invertido equipado com luz epifluorescente.

4.12 Análise das regiões microssatélites

Para confirmar a identidade genética entre as células doadoras de núcleo, o bezerro e os fetos abortados, assim como excluir as receptoras como mães biológicas do bezerros e dos fetos, amostras de sangue e de pêlo foram colhidas para análise das regiões

microsatélites. Estas amostras foram processadas pelo Laboratório LinkGen Biotecnologia Veterinária S/C localizado em Araçatuba – SP (PIPE FAPESP – Processo 98/14866-8). Após extração do DNA genômico seguindo protocolo de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), as amostras foram analisadas para 11 regiões microsatélites bovinas (BM2113, TGLA122, BM1818, RM067, ETH10, INRA023, TGLA126, SPS115, ETH225, BM1824, RM006). Duas reações de multiplex PCR foram realizadas: multiplex 1 (ETH 10, TGLA 126, RM 067, SPS 115, INRA 023 e ETH 225) e multiplex 2 (RM 006, TGLA 122, BM 1824, BM 1818 e BM 2113). Cada reação de PCR consistiu de 10X PCR buffer AmpliTaq Gold (Applied Biosystems®), 2,5 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de cada dNTP, 10 ng de DNA, 1 UI de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems®), 10 pmol de cada primer (para cada par de primer, um deles foi corado com sonda fluorescente - 6-FAM, HEX ou TAMRA, dependendo do tamanho do fragmento amplificado, para permitir análise em uma única eletroforese). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PTC 100 MJ Research®). Depois da primeira etapa de desnaturação a 95°C durante 5 min, seguido por 85°C durante 10 min, foram realizados 5 ciclos de desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (58°C / 30 s) e extensão (72°C / 30 s) e 26 ciclos de desnaturação (94°C / 45 s), anelamento (58°C / 30 s) e extensão (72°C / 30 s). O último passo foi conduzido a 72°C durante 10 min para garantir a extensão final das moléculas de DNA. Em 1 µl de cada multiplex foram adicionados 12 µl de formamida 1 µl de marcador de peso molecular (ROX 500 – Applied Biosystems®), sendo este material colocado em sequenciador de DNA automatizado (ABI Prism 310 – Applied Biosystems®).

4.13 Análise estatística

Para análise do desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* (respectivamente, taxas de blastocisto e prenhez) foi empregado o teste Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%. Para analisar o número médio de células dos blastocistos foi utilizado o programa The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). Os dados foram testados pelo aplicativo Guided Data Analysis quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, os dados foram transformados (Logarítimo da base 10 – $\text{Log}_{10}X$; raiz quadrada – $\text{RQ } X$; Quadrado – X^2) e se a normalidade não fosse alcançada, empregava-se o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os erros padrões das médias dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados transformados, quando necessária a transformação. Na análise do número de células embrionárias, a variável número de células por embrião não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo então empregada a transformação para logarítimo na base 10 (Log_{10}) para que fosse alcançada a normalidade. Esta variável foi submetida ao teste Tukey de médias ($p < 0,05$), para verificar diferenças entre os embriões FIV e clonados.

5 RESULTADOS

Os resultados mostraram que os melhores períodos para aumentar a eficiência na enucleação de oócitos são 16 e 18 horas de maturação (Tabela 1). Embora estes grupos tenham apresentado menor taxa de oócitos maduros (respectivamente 39% e 59%), o número de estruturas classificadas como adjacentes foi maior nestes horários, facilitando e otimizando a enucleação.

Tabela 1 - Porcentagem de oócitos em cada estágio do ciclo celular após diferentes períodos de maturação, São Paulo – 2003

Estádios de Maturação		16 horas	18 horas	20 horas	22 horas	24 horas
		% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
Vesícula Germinativa		1,9 (2) ^a	3,3 (4) ^a	0,9 (1) ^a	0,9 (1) ^a	0 (0) ^a
Metáfase I		46,7 (49) ^a	26,9 (32) ^{ab}	13,8 (15) ^b	21,6 (24) ^b	18,6 (21) ^b
Anáfase		9,5 (10) ^a	7,6 (9) ^a	7,3 (8) ^a	4,5 (5) ^a	5,3 (6) ^a
Telófase		2,8 (3) ^a	3,4 (4) ^a	1,8 (2) ^a	0,9 (1) ^a	2,6 (3) ^a
Metáfase II	Adjacência	32,4 (34) ^a	35,3 (42) ^a	22,9 (25) ^b	13,5 (15) ^b	21,2 (24) ^b
	Mesmo Hemisfério	3,8 (4) ^b	15,1 (18) ^{ab}	35,8 (39) ^a	41,5 (46) ^a	34,6 (39) ^a
	Hemisfério Oposto	2,9 (3) ^a	8,4 (10) ^a	17,5 (19) ^a	17,1 (19) ^a	17,7 (20) ^a
Total de oócitos em MII		39,1 (41) ^b	58,8 (70) ^{ab}	76,2 (83) ^a	72,1 (80) ^{ab}	73,5 (83) ^{ab}

Letras iguais sobrescritas dentro de cada estágio de maturação e na mesma linha não apresentam diferença significativa.

A tabela 2 mostra a eficiência da maturação e da enucleação de oócitos bovinos micromanipulados após 17 horas de maturação para reconstrução com fibroblastos fetal e adulto. Para reconstrução com fibroblasto fetal foram realizadas 33 manipulações totalizando 2219 oócitos, sendo que 1296 (58,4%) estruturas atingiram o estágio de MII. Dos 1296 oócitos maduros, 782 (60,3%) foram enucleados com sucesso. Para reconstrução com fibroblasto adulto foram realizadas 28 manipulações totalizando 2405 oócitos, sendo que 1313 (54,6%) estruturas atingiram o estágio de MII. Dos 1313 oócitos maduros, 686 (52,2%) foram enucleados com sucesso.

Tabela 2 – Eficiência da maturação e da enucleação de oócitos maturados *in vitro* para reconstrução com fibroblastos fetal e adulto, São Paulo – 2003

Célula doadora de núcleo	Oócitos em maturação N (repetições)	Oócitos maduros (MII) N (%)	Oócitos enucleados N (%)*
TN ¹ - Fibroblasto fetal	2219 (33)	1296 (58,4) ^a	782 (60,3) ^a
TN ¹ - Fibroblasto adulto	2405 (28)	1313 (54,6) ^b	686 (52,2) ^b

*Valor calculado em função do número de oócitos maduros

¹TN = Transferência Nuclear

^{a, b} Letras iguais entre linhas na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P<0,05)

Oócitos maduros: P=0,0098597

Oócitos enucleados: P= 0,0000368

A tabela 3 mostra as taxas de fusão e de desenvolvimento *in vitro* de embriões reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto. Na primeira fase, de 782 oócitos enucleados com sucesso, 668 foram reconstruídos com fibroblasto fetal, sendo que 212 (31,7%) fusionaram, 193 (91,0%) clivaram e 32 (15,1%) atingiram o estágio de blastocisto. Na segunda fase, de 686 oócitos enucleados com sucesso, 569 foram reconstruídos com fibroblasto adulto, sendo que 181 (31,8%) fusionaram, 130 (71,8%) clivaram e 30 (16,6%) atingiram o estágio de blastocisto.

Tabela 3 – Desenvolvimento *in vitro* de embriões reconstruídos (TN) com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vitro* (FIV), São Paulo – 2003

Grupos	Total de embriões N (repetições)	Fusão N (%)	Clivagem N (%)	Blastocistos N (%)
TN ¹ -Fibroblasto fetal	668 (33)	212 (31,7) ^a	193 (91,0) ^a	32* (15,1) ^a
TN ¹ -Fibroblasto adulto	569 (28)	181 (31,8) ^a	130 (71,8) ^b	30* (16,6) ^a
FIV ² -Controle	1611 (12)	-	1210 (75,1) ^b	516 (32,0) ^b

* Valor calculado em função do número de oócitos fusionados

¹ TN = Transferência Nuclear

² FIV = Fecundação *in vitro*

^{a, b} Letras iguais entre linhas na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P<0,05)

Clivagem fetal x adulto: P=0,0000014

Clivagem fetal x controle: P=0,0000004

Blastocisto fetal x controle: P=0,0000092

Blastocisto adulto x controle: P=0,0002283

A tabela 4 mostra as taxas de prenhez aos 30 e 90 dias após a transferência dos blastocistos reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vivo* (TE – Controle). Foram transferidos, à fresco, 18 blastocistos oriundos de fibroblasto fetal para 14 receptoras. Trinta dias após a transferência, das 14 receptoras, 5 (35%) estavam prenhes de feto único. Entretanto, 90 dias após a transferência, uma segunda avaliação ultra-sonográfica diagnosticou 2 (40%) perdas embrionárias. No tocante a célula adulta, foram transferidos, à fresco, 21 blastocistos para 11 receptoras. Trinta e noventa dias após a transferência, 4 (19%) receptoras estavam prenhes de feto único. No entanto, entre o quarto e quinto mês de gestação duas receptoras abortaram, não sendo encontrados os fetos. Das outras duas receptoras, uma apresenta quadro de hidroalantóide, sendo constantemente monitorada para retirada de parte do líquido do alantóide. Nas 4 intervenções foram retirados 31, 10, 60 e 29 litros, respectivamente.

Como controle, foram transferidos 111 embriões à fresco para 111 receptoras, sendo diagnosticadas 62 prenhezes (55,9%) aos 60 dias.

Tabela 4 – Taxas de prenhez após transferência de blastocistos reconstruídos (TN) com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vivo* (TE - Controle), São Paulo – 2003

Grupos	Blastocistos transferidos	Número de receptoras	Taxa de prenhez aos 30 dias (%)	Taxa de prenhez aos 90 dias (%)
TN ¹ - Fibroblasto fetal	18	14	5* (27,8) ^a	3* (16,7) ^a
TN ¹ - Fibroblasto adulto	21	11	4* (19,0) ^a	4* (19,0) ^a
TE ² – Controle	111	111	-	62 (55,9) ^b

* Valor calculado em função do número de embriões transferidos

¹TN = Transferência Nuclear

²TE = Embriões produzidos *in vivo*

^{a, b} Letras iguais entre linhas na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P<0,05).

Fetal x controle: P=0,0046462

Adulto x controle: P=0,0042956

A primeira receptora prenhe de embrião reconstruído com célula fetal foi submetida a cesariana aos 290 dias de gestação após constatação de que não havia sinais de trabalho de parto. A cirurgia foi realizada com êxito e deu origem a um bezerro de 34 kg sem raça definida (Figura 6) que recebeu o nome de Marcolino da USP. O animal que tinha tamanho e peso normal para a espécie apresentou, na primeira semana de vida, infecção umbilical e broncopneumonia. Estes problemas foram prontamente superados após antibioticoterapia.

Figura 6 – Clone oriundo de célula fetal com 1 (A), 4 (B) e 14 (C e D) meses de idade

A segunda receptora prenhe de embrião reconstruído com célula fetal morreu aos 229 dias de gestação com hidroalantóide (Figura 7A). A necropsia mostrou cornos uterinos aumentados de volume, congestão pulmonar e membranas placentárias edematosas. Foi realizada necropsia do feto (Figura 7B), não sendo encontrada nenhuma alteração macroscópica digna de

nota. Amostras de vários tecidos (sangue, pulmão, rim, fígado, timo etc.) foram colhidas para análise das regiões microssatélites e exame histopatológico.

Figura 7 – A) Útero com hidroalantóide. B) Feto clonado

A terceira receptora prenhe de embrião reconstruído com célula fetal abortou aos 252 dias de gestação. Foi realizada necropsia do feto (Figura 8A) que apresentou má formação mandibular (não havia fusão da mandíbula) (Figura 8B) e sinais de edema generalizado. Amostras de sangue foram colhidas para análise das regiões microssatélites.

Figura 8 – A) Clone abortado. B) Fenda mandibular (seta)

A tabela 5 mostra a análise de 11 regiões microssatélites *loci* do DNA genômico provenientes das células doadoras de núcleo (fibroblasto fetal) e dos bulbos capilares das 3 receptoras, do bezerro e dos 2 fetos. A análise mostrou identidade genética entre o bezerro, os fetos e as células doadoras de núcleo e excluiu as receptoras como “mães” biológicas.

Tabela 5 – Análise das regiões microssatélites de 11 *loci* das células doadoras de núcleo, dos bezerros (1, 2 e 3) e das receptoras (1, 2 e 3), Araçatuba – 2003

Locus / alelo	Fibroblasto fetal	Bezerro 1	Receptora 1	Bezerro 2	Receptora 2	Bezerro 3	Receptora 3
BM2113	129/135	129/135	123/131	129/135	ND	129/135	131/133
TGLA122:	145/154	145/154	138/138	145/154	ND	145/154	145/168
BM1818:	259/259	259/259	261/261	259/259	ND	259/259	257/259
RM067:	83/83	83/83	83/95	83/83	ND	83/83	83/83
ETH10:	211/211	211/211	207/219	211/211	ND	211/211	212/212
INRA023:	203/211	203/211	207/211	203/211	ND	203/211	208/208
TGLA126:	117/121	117/121	115/115	117/121	ND	117/121	115/115
SPS115:	243/245	243/245	241/245	243/245	ND	243/245	241/245
ETH225:	138/154	138/154	154/154	138/154	ND	138/154	138/142
BM1824:	177/179	177/179	177/181	177/179	ND	177/179	179/181
RM006:	106/112	106/112	112/118	106/112	ND	106/112	116/110

ND = Não determinado

A tabela 6 e a figura 9 mostram o número médio de células de blastocistos reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vitro* (controle). O número médio de células de blastocistos reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vitro*, foi, respectivamente, 129,6, 101,3 e 114,3.

Tabela 6 – Número de células dos blastocistos reconstruídos (TN) com fibroblastos fetal e adulto e fecundados *in vitro* (FIV), São Paulo – 2003

Grupos	Número de embriões	Número médio de células ± Erro padrão da média
TN ¹ - Fibroblasto Fetal	10	129,6 ± 16,98 ^a
TN ¹ - Fibroblasto Adulto	06	101,3 ± 25,45 ^a
FIV ² - Controle	06	114,3 ± 21,62 ^a

¹ TN = Transferência Nuclear

² FIV = Fecundação *in vitro*

^{a, b} Letras iguais entre linhas na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P<0,05)

Figura 9 - Blastocistos (7º dia do desenvolvimento) corados com Hoechst 33342 para determinação do número de células. A) reconstruído com fibroblasto fetal e B) fecundado *in vitro*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo comparou a eficiência do uso de células somáticas jovens e adultas (fibroblastos fetal e adulto) na clonagem de embriões bovinos. A produção de bovinos a partir da técnica de Transferência Nuclear utilizando células somáticas diferenciadas possibilitou a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos em larga escala e também a de bovinos transgênicos (geneticamente modificados). No entanto, as taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões clonados a partir de células diferenciadas são extremamente baixas, sendo que o sucesso na clonagem de animais é, na maioria das vezes, não superior a 1% (BORDIGNON, 2003; HAN et al., 2003; KOO et al., 2002). Este insucesso deve-se, principalmente, a baixa taxa de implantação, pelos freqüentes problemas placentários e pela alta mortalidade embrionária, fetal e perinatal. Esses problemas, segundo Bordignon (2003), ocorrem porque núcleos de células diferenciadas não são corretamente reconduzidos ao estágio embrionário nos embriões clonados (reprogramação nuclear) e este provocaria a expressão errônea de genes que são necessários para sustentar o desenvolvimento normal. Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reprogramação nuclear representa um dos principais desafios para aumentar a eficiência da clonagem. Para avaliar se a reprogramação nuclear ocorre de maneira mais eficiente em células diferenciadas jovens, este trabalho comparou o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões clonados reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto.

O método mais freqüentemente empregado para a enucleação de oócitos consiste na aspiração de parte do citoplasma adjacente ao primeiro corpúsculo polar. No entanto, neste experimento, a enucleação foi realizada empregando outro método descrito por Fuliang³ (informação verbal). Após a realização de um corte na zona pelúcida bem próximo ao 1º corpúsculo polar, os oócitos foram levemente pressionados com auxílio da pipeta de enucleação para que saíssem o 1º corpúsculo polar e pequena porção do citoplasma adjacente ao corpúsculo. Esta técnica de enucleação proporciona maior controle da quantidade de

³ Informação verbal fornecida por Fuliang Du durante visita a Transgenic Animal Facility, College of Agriculture and Natural Resources, University of Connecticut, Storrs – CT, USA, 2001.

citoplasma removido, sendo que este volume de citoplasma interfere diretamente nas taxas de fusão e de blastocisto (PEURA; LEWIS; TROUNSON, 1998; ZAKHARTCHENKO et al., 1997). Normalmente os oócitos são enucleados em meio contendo citocalasina, um desestabilizador reversível dos filamentos de actina, para dar maior elasticidade aos oócitos durante a micromanipulação (BORDIGNON; SMITH, 2002). Também é necessária a coloração dos oócitos com Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta para visualização da cromatina e confirmação da enucleação. Embora a exposição de oócitos à luz ultravioleta, mesmo que por breve período, seja prática bastante comum nos experimentos de clonagem, Smith (1993) observou efeito tóxico da luz ultravioleta sobre oócitos. Desta maneira, no presente experimento, os oócitos foram micromanipulados em meio sem citocalasina ou corantes (PBS suplementado com 20% SFB) e apenas o citoplasma removido e o 1º corpúsculo polar foram corados e expostos à luz ultravioleta. Com isso eliminamos os prováveis efeitos tóxicos do Hoechst 33342 e da luz ultravioleta sobre os oócitos.

Os oócitos utilizados para produção de citoplasmas receptores estão normalmente na fase final da maturação meiótica (metáfase II). Para tanto, a maturação até este estágio pode ser feita *in vivo* ou *in vitro*. Uma das vantagens da maturação *in vivo* é a de que os oócitos adquirem maior capacidade de suportar o desenvolvimento embrionário após a reconstrução (BORDIGNON; SMITH, 2002). No entanto, no presente trabalho, optou-se pela maturação *in vitro* pela facilidade em conseguir grande número de oócitos (ovários de matadouro) e pelo baixo custo de obtenção deste material. Para aumentar a eficiência da enucleação, avaliou-se diferentes períodos de maturação *in vitro*, procurando estabelecer o melhor momento para realizar a enucleação dos oócitos. Oócitos foram cultivados por 16, 18, 20, 22 e 24 horas e avaliados quanto ao estágio de maturação. Os resultados mostraram que os melhores períodos para aumentar a eficiência na enucleação de oócitos são 16 e 18 horas de maturação. Embora esses dois primeiros períodos apresentem menor taxa de oócitos maduros em

relação ao grupo 24 horas (respectivamente, 39%, 59% e 73,5%), o número de estruturas apresentando a placa metafásica próxima ao 1º Corpúsculo Polar foi maior. A enucleação, feita após 17 horas de maturação, proporcionou taxas de enucleação de 60,3% e 52,2%, respectivamente, para fibroblasto fetal e adulto. Kasinathan et al. (2001), Hill et al. (2000) e Booth et al. (2003) iniciaram a enucleação após 18, 19 e 18 horas de maturação, respectivamente, no entanto, os autores não relatam a eficiência da enucleação nestes horários. No presente experimento, as taxas de maturação e de enucleação foram maiores na etapa que empregou-se fibroblasto fetal do que na fase com fibroblasto adulto (respectivamente, 58,4% e 60,3%; 54,6% e 52,2%). Provavelmente estas diferenças são explicadas pelas diferentes épocas em que foram desenvolvidas as etapas e pelo número de oócitos manipulados em cada grupo. Pelo fato de ter sido utilizado o mesmo protocolo de maturação *in vitro* (composição do meio e tempo de cultivo) e de uma única pessoa ter feito a micromanipulação (enucleação), não era esperada esta diferença entre os grupos (fibroblastos fetal e adulto) no tocante a taxa de maturação e de enucleação.

A coordenação das fases do ciclo celular do oócito e das células doadoras de núcleo é bastante importante e deve ser considerada para que não comprometa a integridade da cromatina do núcleo doador. Evidências sugerem que núcleos transplantados no estágio G0 do ciclo celular teriam a reprogramação nuclear facilitada (WILMUT et al., 1997). Desta maneira, usualmente as células doadoras de núcleos são cultivadas por períodos que variam de 2 a 5 dias em meio com baixa concentração de soro (0,5%) antes da transferência nuclear. No entanto, clones já foram produzidos com sucesso a partir de células adultas não privadas de soro (CIBELLI; STICE; GOLUEKE, 1998; LANZA et al., 2000). Em relação aos citoplasmas receptores, oócitos em metáfase II têm sido os mais freqüentemente utilizados, embora zigotos e oócitos em metáfase I também já tenham sido empregados com sucesso em experimentos de clonagem (MIYOSHI et al., 2001; WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 2001). Quando utiliza-se

oócitos em metáfase II, a alta atividade de MPF (Fator de Indução da Mitose / Meiose) presente nesta fase pode degradar a membrana nuclear, condensar ou pulverizar a cromatina e alterar a ploidia do embrião reconstruído (BORDIGNON, 2003). Isto particularmente ocorre quando oócitos em metáfase II são fundidos com células embrionárias que, na maioria das vezes, estão em intérfase.

As taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões reconstruídos com fibroblasto fetal e adulto não diferiram estatisticamente, no entanto, ambas foram significativamente inferiores ao controle (embriões fecundados *in vitro*). Os resultados mostraram que células diferenciadas jovens (fibroblasto fetal) não proporcionaram melhores taxas de desenvolvimento em relação às células diferenciadas adultas (fibroblasto adulto). A menor taxa de desenvolvimento *in vitro* dos embriões clonados em relação ao grupo controle (FIV) pode ser explicada pela excessiva manipulação dos oócitos e dos embriões durante as várias etapas do processo de clonagem (enucleação, estímulo elétrico, exposição aos meios de ativação etc.) e também pelas possíveis falhas durante a reprogramação nuclear. Han et al. (2003) demonstraram um padrão anormal de metilação em várias regiões genômicas de embriões bovinos clonados. Estes resultados evidenciam que falhas no desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões clonados seriam devidas a reprogramação epigenética incompleta do DNA genômico da célula doadora. Diferente dos resultados mostrados no presente trabalho, Koo et al. (2002) não encontraram diferença estatística no desenvolvimento entre embriões reconstruídos com célula fetal e fecundados *in vitro* (27,3% e 28,2%). Hill et al. (2000) também não encontraram diferença no desenvolvimento *in vitro* entre embriões bovinos reconstruídos com fibroblastos fetal (43%) e adulto (28%).

As taxas de prenhez aos 90 dias não apresentaram diferença estatística entre blastocistos clonados com fibroblastos fetal (21,4%) e adulto (36,4%), no entanto, ambas taxas foram inferiores ao grupo controle (55,9%). A menor taxa de gestação dos embriões clonados em

relação ao grupo controle pode ser explicada pelas possíveis falhas ocorridas durante a reprogramação nuclear que, entre outras coisas, provocaria a inadequada formação da placenta. Altas taxas de mortalidade embrionária têm sido observadas em estádios iniciais e finais da gestação de clones bovinos (BORDIGNON; SMITH, 2002). Os altos índices de perdas no início da gestação em bovinos têm sido atribuídos à má formação da placenta (HILL et al., 2002) e a menor capacidade de embriões clonados secretarem a proteína interferon-tau responsável pelo reconhecimento materno da gestação (STOJKOVIC et al., 1999). Hill et al. (2000) obtiveram maior taxa de prenhez com embriões reconstruídos com célula adulta do que com célula fetal. Os autores atribuem esta diferença à uma possível alteração no cariótipo das células fetais durante o cultivo e ao reduzido número de embriões transferidos. Yamazaki (2001) obteve 27,3% de gestação, aos 60 dias, após transferir 19 embriões reconstruídos com célula adulta para 11 receptoras. No entanto apenas uma gestação progrediu a termo. Pace et al. (2002) obtiveram 24,7% de prenhez após transferirem 2170 embriões clonados. Destas 535 prenhez, 75,1% (402) abortaram, 5,6% (30) apresentaram hidropsia e 19,3% (103) evoluíram a termo. Os resultados do desenvolvimento *in vivo* dos embriões reconstruídos com célula fetal do presente experimento revelaram alta mortalidade, principalmente, no terço final de gestação. Estas perdas foram decorrentes de má formação da placenta, provocando hidroalantóide, e de má formação fetal. Nestes dois casos, falha na reprogramação nuclear com expressão anormal de determinados genes poderia ser apontada como possível causa destas perdas. Hill et al. (2000) compararam as perdas de gestações, durante o primeiro trimestre, de embriões reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto e de embriões produzidos *in vivo* (grupo controle). Aos 30 dias, as taxas de prenhez foram semelhantes nos 3 grupos, porém, aos 90 dias, 82% dos fetos clonados morreram ao passo que todos os do grupo controle permaneceram viáveis. Os autores relacionaram a alta taxa de mortalidade às anormalidades de placenta (67%), principalmente, desenvolvimento rudimentar com reduzido número de cotilédones. Hill et al. (1999) estudaram gestações de clones

produzidos com fibroblastos fetais transfectados com gene da β -lactosidase. De 13 receptoras que atingiram o terceiro trimestre de gestação, 6 (46%) apresentaram hidropsia, sendo que 3 morreram a 2 meses do parto, uma abortou no oitavo mês e 8 pariram. Dos 8 nascimentos, 5 foram considerados saudáveis após exame clínico. As altas taxas de mortalidade embrionária e de abortos após a transferência de blastocistos clonados encontradas no presente experimento também já haviam sido descritas em outros trabalhos nas espécies bovina, ovina e murina (CIBELLI; STICE; GOLUEKE, 1998; WAKAYAMA et al., 1998; WELLS et al., 1999; WILMUT et al., 1997). Embora as elevadas perdas durante todas as fases da gestação seja o resultado mais freqüente, Kato et al. (1998) relataram altas taxas de prenhez (80%) progredindo a termo após transferir embriões reconstruídos com células da granulosa e do oviduto. Para investigar a origem da alta incidência de anormalidades placentárias, Koo et al. (2002) estudaram a distribuição de células da massa celular interna e do trofoectoderma em blastocistos reconstruídos com célula fetal. Enquanto que em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* a proporção de células da massa celular interna em relação ao total de células é de 20% a 40%, Koo et al. (2002) observaram que em embriões clonados 50% do total das células estão presentes na massa celular interna. Esta alocação anormal de células do trofoectoderma nos embriões clonados explicaria em parte a alta freqüência de anormalidades placentárias.

Os problemas relacionados a clones não ficam limitados às gestações. Mesmo naquela limitada proporção de gestações que vão a termo, é bastante comum clones natimortos ou que sobrevivem por poucas horas ou dias. Pace et al. (2002) observaram que em 117 gestações de clones que progrediram a termo, houve 11 (9,4%) natimortos e 24 (22,6%) bezerros que morreram logo após o nascimento. As principais anomalias responsáveis pela morte dos recém nascidos clonados incluem disfunções respiratórias, aumento do peso ao nascer ou síndrome do bezerro gigante (“large calf syndrome” ou LCS), má formação de rins e cérebro, deficiência imunológica, anomalias umbilicais com infecções e úraco persistente, edema

generalizado e ascite (BORDIGNON; SMITH, 2002; HAN et al., 2003). A LCS é um fenótipo observado em clones de bovinos, ovinos e murinos recém nascidos e sua causa ainda não está completamente elucidada (HAN et al., 2003). Evidências sugerem que o sistema de cultivo *in vitro* possa ser responsável pela LCS já que alguns animais oriundos de fecundação *in vitro* também apresentam esta síndrome.

A qualidade dos embriões clonados a partir de fibroblastos fetal e adulto foi avaliada pelo número total de células dos embriões em estágio de blastocisto. Verificou-se que os embriões clonados, independentemente do tipo de célula utilizada como doadora de núcleo, apresentaram qualidade semelhante aos embriões fecundados *in vitro* (controle). Koo et al. (2002) também não observaram diferença no número total de células de blastocistos reconstruídos com célula fetal e embriões fecundados *in vitro*. Estes resultados diferem dos descritos por Yamazaki (2001) e Takano et al. (1997) que encontraram menor número de células em embriões clonados a partir de fibroblasto adulto. Tal discordância pode ser explicada pela diferença entre os protocolos utilizados para produção dos embriões clonados (injeção intracitoplasmática, método de ativação, meio e atmosfera de cultivo dos embriões). Neste trabalho, a semelhante qualidade entre os embriões clonados e os fecundados *in vitro*, avaliados pelo número de células, não foi confirmada pelas taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*, pois as taxas de prenhez foram estatisticamente maiores no grupo controle. Este fato pode ser explicado pela alocação ou distribuição anormal das células da massa celular interna e do trofoectoderma como discutido anteriormente, ou seja, os embriões apresentaram mesmo número total de células mas não a mesma distribuição e este fato provocaria diminuição das taxas de blastocisto e de prenhez.

O presente trabalho mostrou que tanto células fetais quanto adultas podem ser empregadas com a mesma eficiência para produção de bovinos clonados. Embora tenham ocorrido perdas no último trimestre de gestação, o nascimento do bezerro Marcolino da USP

mostrou que fibroblastos fetais podem ser empregados como doadores de núcleos em experimentos de Transferência Nuclear, gerando animal saudável. Embora haja grande interesse na utilização da Transferência Nuclear nas áreas da produção animal, biomedicina, biotecnologia e na pesquisa básica, a expansão e difusão desta tecnologia estão limitadas pela baixa eficiência de todo o processo de clonagem. O melhor entendimento dos eventos envolvidos na reprogramação nuclear poderá trazer resultados mais previsíveis e com maior reprodutibilidade, tornando a técnica mais segura, tanto para pesquisa quanto para a produção animal.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- 1) A maior taxa de enucleação foi conseguida após 16 a 18 horas de maturação *in vitro* dos oócitos.
- 2) Embriões reconstruídos pela Transferência Nuclear com fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo apresentaram taxas semelhantes de desenvolvimento *in vitro*, porém, inferiores aos embriões fecundados *in vitro* (Controle).
- 3) Embriões reconstruídos com fibroblastos fetal e adulto apresentaram taxas semelhantes de prenhez, porém, inferiores aos embriões fecundados *in vivo* (Controle).
- 4) Embriões reconstruídos com fibroblasto fetal e adulto, assim como fecundados *in vitro* (Controle), apresentaram, em média, número semelhante de células.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 3th ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1294 p.

BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D.T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTROM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.

BOOTH, P. J.; VIUFF, D.; TAN, S.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 922-928, 2003.

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

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Clonagem Animal por Transferência Nuclear. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 281-302.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proceeding of the National Academic Society**, v. 38, n. 4, p. 455-463, 1952.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE de LEON, F. A.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. **Science**, v. 280, n. 5367, p. 1256-1258, 1998.

COLLAS, P.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 3, p. 492-500, 1992.

COLLAS, P.; BARNES, F. L. Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. **Molecular Reproduction and Development**, v. 38, n. 3, p. 264-267, 1994.

ECTORS F. J.; DELVAL, A.; SMITH, L. C.; TOUATI, K.; REMY, B.; BECKERS, J. F.; ECTORS, F. Viability of cloned bovine embryos after one or two cycles of nuclear transfer and *in vitro* culture. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 925-933, 1995.

FULKA, J.; FIRST, N. L.; LOI, P.; MOOR, R. M. Cloning by somatic cell nuclear transfer. **BioEssays**, v. 20, n. 10, p. 847-851, 1998.

FULKA, J.; FIRST, N. L.; MOOR, R. M. Nuclear transplantation in mammals: remodelling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. **BioEssays**, v. 18, n. 10, p. 835-840, 1996.

GOTO, K.; TANAKA, M.; OOKUTSU, S.; NAKANISHI, Y. Production of a nuclear transferred calf by the intracytoplasmic injection of donor cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n. 3, p. 257-260, 1997.

HAN, Y. M.; KANG, Y. K.; KOO, D. B.; LEE, K. K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 33-44, 2003.

HEYMAN, Y.; CHESNÉ, P.; LEBOURHIS, D.; PEYNOT, N.; RENARD, J. P. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: *in vivo* versus *in vitro*. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 695-702, 1994.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1451-1465, 1999.

HILL, J. R.; SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 55-63, 2002.

HILL, J. R.; WINGER, Q. A.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; THOMPSON, J. A.; WESTHUSIN, M. E. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1135-1140, 2000.

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.

KANKA, J.; SMITH, S. D.; SOLOY, E.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, n. 3, p. 253-263, 1999.

KASINATHAN, P.; KNOTT, J. G.; MOREIRA, P. N.; BURNSIDE, A. S.; JERRY, D. J.; ROBL, J. M. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, , n. 5, p. 1487-1493, 2001.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2095-2098, 1998.

KOO, D. B.; KANG, Y. K.; CHOI, Y. H.; PARK, J. S.; KIM, H. N.; OH, K. B.; SON, D.S.; PARK, H.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 487-492, 2002.

LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; BLACKWELL, C.; CRISTOFALO, V. J.; FRANCIS, M. K.; BAERLOCHER, G. M.; MAK, J.; SCHERTZER, M.; CHAVEZ, E. A.; SAWYER, N.; LANSDORP, P. M.; WEST, M.D. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 665-669, 2000.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA, J.; CAPPAL, P.; MOOR, R. M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 5, p. 1177-1187, 1998.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1317-1319, 1984.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryos by microsurgery and cell fusion. **Science**, v. 220, n. 4603, p. 1300-1302, 1983.

MELLO, M. R. B.; CAETANO, H. V. A.; MARQUES, M. G.; PADILHA, M. S.; GARCIA, J. F.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; LIMA, A. S.; NICACIO, A. C.; MENDES, C. M.; OLIVEIRA, V. P.; VISINTIN, J. A.. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 11, p. 1485-1489, 2003.

MIYOSHI, K.; RZUCIDLO, S. J.; GIBBONS, J. R.; ARAT, S.; STICE, S. L. Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in α protein-free medium. **BMC Development Biology**, v. 1, n. 1, p. 12, 2001.

ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T.; MIKAWA, S.; TAKEDA, K.; AWATA, T.; HANADA, H.; PERRY, A. C. F. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, v. 289, n. 5482, p. 1188-1190, 2000.

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. M.; FORSBERG, E. J.; GOLUEKE, P. J.; GRABER, D. F.; KEMPER, J. C.; KOPPANG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICA, P. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 334-339, 2002.

PRATHER, R. S.; BARNES, F. L.; SIMS, M. M.; ROBL, J. M.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Nuclear transfer in mammalian embryos: 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.; MACHÁTY, Z. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 487-498, 1999.

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.

QUEIROZ, L. M. V. **Clonagem de embriões bovinos: uso de ovócitos ativados e pré-ativados como citoplasma receptor**. São Paulo, 1998. 59f. Dissertação (Mestrado em reprodução animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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

ROBL, J. M.; PRATHER, R.; BARNES, F.; EYESTONE, W.; NORTHEY, D.; GILLIGAN, B.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 2, p. 642-647, 1987.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., AND MANIATIS, T. **A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 1989.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 859, 2002.

SMITH, S. D.; SOLOY, E.; AVERY, B.; HOLM, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Nucleus remodeling in reconstructed cattle embryos. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 298, 1994.

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

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3th ed. Savoy: EUA, 1998, 180p.

STICE, S. L.; KEEFER, C. L. Multiple generational bovine embryo cloning. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 4, p. 715-719, 1993.

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

STICE, S. L.; ROBL, J. M.; PONCE DE LEON, F. A.; JERRY, J.; GOLUEKE, P. G.; CIBELLI, J. B.; KANE, J. J. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 129-138, 1998.

STOJKOVIC, M.; BUTTNER, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; RIEDL, J.; REICHENBACH, H. D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long term culture: comparison of *in vivo* derived, *in vitro* produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 55, n. 3-4, p. 151-162, 1999.

TAKANO, H.; KOZAI, C.; SHIMIZU, S.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Cloning of bovine embryos by multiple nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 47, n. 7, p. 1365-1373, 1997.

UHM, S.G.; KIM, N. H.; KIM, T.; CHUNG, H. M.; CHUNG, H. K.; LEE, T. H.; CHUNG, K. S. Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistant (Neo^R) genes in porcine embryos following nuclear transfer with porcine fetal fibroblasts transfected by retrovirus vector. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 331-337, 2000.

VERMA, P. J.; DU, Z.; CROCKER, L.; FAAST, R.; GRUPEN, C. G.; McILFATRICK, S. M.; ASHMAN, R. J.; LYONS, I. G.; NOTTLE, M. B. *In vitro* development of porcine nuclear transfer embryos constructed using fetal fibroblasts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 3, p. 262-269, 2000.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Letters to Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369-374, 1998.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 49-60, 2001.

WANG, W.; MACHATY, Z.; RUDDOCK, N.; ABEYDEERA, L. R.; BOQUEST, A. C.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: effects of extracellular calcium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 99-197, 1999.

WELLS, D. N. Animal cloning: current progress, challenges and future prospects. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 2, p. 86-97, 1999.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; DAY, A. M.; TERVIT, H. R. 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.; COLLAS, P.; MAREK, D.; SULLIVAN, E.; STEPP, P.; PRYOR, J.; BARNES, F. 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.

WESTHUSIN, M. E.; PRYOR, J. H.; BONDIOLI, K. R. Nuclear transfer in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, n. 2, p. 119-123, 1991.

WILLADSEN, S. M. Cloning of sheep and cow embryos. **Genome**, v. 31, n. 2, p. 956-962, 1989.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v. 320, n. 6057, p. 63-65, 1986.

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

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Letters to Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

WOLF, E.; BOXHAMMER, K.; BREM, G.; PRELLE, K.; REICHENBACH, D.; REISCHL, J.; SANTL, B.; SCHERNTHANER, W.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; ZAKHARTCHENKO, V. Recent progress in the *in vitro* production and cloning of bovine embryos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 26, n. 1, p. 160-178, 1998. Suplemento.

WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K.; LI, G. P.; ASTON, K. I.; BUNCH, T. D.; MEERDO, L. N.; PATE, B. J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Scienceexpress*. Disponível em: (www.scienceexpress.org). Acesso em: 29 maio 2003.

YAMAZAKI, W. **Clonagem em bovinos utilizando-se células somáticas de animais adultos: avaliação comparativa da reconstituição de citoplastos pelas técnicas de transferência nuclear e injeção nuclear intracitoplasmática**. Jaboticabal – SP, 2001. 131f. Dissertação (Mestrado em reprodução animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; UNESP, Jaboticabal, 2001.

ZAKHARTCHENKO, V.; DURCOVA-HILLS, G.; SCHERNTHANER, W.; STOJKOVIC, M.; REICHENBACH, H.D.; MUELLER, S.; STEINBORN, R.; MUELLER, M.; WENIGERKIND, H.; PRELLE, K.; WOLF, E.; BREM, G. Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 421-426, 1999a.

ZAKHARTCHENKO, V.; DURCOVA-HILLS, G.; STOJKOVIC, M.; SCHERNTHANER, W.; PRELLE, K.; STEINBORN, R.; MULLER, M.; BREM, G.; WOLF, E. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 115, n. 2, p. 325-331, 1999b.

ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G.; WOLF, E.; BREM, G. Enucleation of bovine oocytes with minimal cytoplasmic volume: effect on development of nuclear transfer embryos. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 238, 1997.

ZAKHARTCHENKO, V.; REICHENBACH, H. D.; RIEDL, J.; PALMA, G. A.; WOLF, E.; BREM, G. Nuclear Transfer in cattle using in vivo-derived vs. *in vitro*-produced donor embryos: effect of developmental stage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, n. 4, p. 493-498, 1996.

ANEXOS

1 - MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM 199	Gibco	11150	10 ml
SFB	Nutricell	-	10 %
PIRUVATO	Sigma	P4562	22 µg/ml
GENTAMICINA	Sigma	G1264	50 µg/ml
FSH	Folltropin - Vetrepharm	-	0,5 µg/ml
LH	Chorulon - Intervet	-	5 UI/ml
17 β ESTRADIOL	Sigma	E4389	1 µg/ml

2 - MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (MEIO FIV)

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TALP STOCK	-	-	10 ml
BSA FATTY FREE	Sigma	A6003	0,6 %
PIRUVATO	Sigma	P4562	22 µg/ml
GENTAMICINA	Sigma	G1264	50 µg/ml

3 - MEIO TALP ESTOQUE

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
NaCl	Sigma	S9625	6,6 mg/ml
KCl	Sigma	P4504	0,24 mg/ml
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M0250	0,1 mg/ml
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S5011	0,041 mg/ml
NaHCO ₃	Sigma	S8875	2,1 mg/ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902	0,3 mg/ml
ACIDO LÁTICO	Sigma	L7900	1,43 µL/ml
VERMELHO FENOL	Sigma	P4633	10 µg/ml

4 - MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV GOTA)

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
MEIO FIV	-	-	3640 µl
HEPARINA	Sigma	H3149	100 µg/ml
PENICILAMINA	Sigma	P5125	2,7 µg/ml
HIPOTAUURINA	Sigma	H1384	1 µg/ml
EPINEFRINA	Sigma	E4250	0,33 µg/ml

5 - MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM 199	Gibco	11150	10 ml
SFB	Nutricell	-	10 %
PIRUVATO	Sigma	P4562	22 µg/ml
GENTAMICINA	Sigma	G1264	50 µg/ml

6 - MEIO DE MICROMANIPULAÇÃO

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
PBS	Nutricell	-	10 ml
SFB	Nutricell	-	20 %

7 - MEIO PARA COLORAÇÃO DE DNA

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM199	Gibco	12340	1000 µl
SFB	Nutricell	-	7,5 %
bisBENZEMIDE	Sigma	B2261	5 µg/ml

8 - SOLUÇÃO PÓS-FUSÃO 1

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM199	Gibco	12340	1000 µL
SFB	Nutricell	-	7,5 %
CITOCALASINA D	Sigma	C8273	2,5 µg/ml
CICLOHEXEMIDE	Sigma	C0934	10 µg/ml

9 - SOLUÇÃO PÓS-FUSÃO 2

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
TCM199	Gibco	12340	1000 µL
SFB	Nutricell	-	7,5 %
CICLOHEXEMIDE	Sigma	C0934	10 µg/ml

10 - SOLUÇÃO DE ELETROFUSÃO (ZIMMERMANN)

REAGENTE	MARCA	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO
SACAROSE	Sigma	S1888	0,28 M
ACETATO DE MAGNÉSIO	Sigma	M9147	0,5 mM
ACETATO DE CÁLCIO	Sigma	C1000	0,1 mM
K ₂ HPO ₄	Sigma	P5504	1 mM
GLUTATIONA	Sigma	G4251	0,1 mM
BSA	Sigma	A6003	0,003%
H ₂ O	-	-	qsp 100 ml