



Otimização do sistema de produção de clones por transferência nuclear de célula somática (NTSC)

Cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer - Procedures optimization

Fabiana Forell¹, Cristiano Feltrin¹, Lucila Carboneiro dos Santos¹, Ubirajara Maciel da Costa², Arnaldo Diniz Vieira², Michael Hölker³ & José Luiz Rodrigues¹

RESUMO

A técnica de transferência nuclear é uma ferramenta que possibilita a produção de embriões clones que podem ser utilizados tanto na clonagem reprodutiva como no modelo para o estudo de diversos mecanismos fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário. Neste sentido, embriões clones bovinos foram produzidos por transferência nuclear, com o objetivo de estabelecer a técnica de clonagem, bem como otimizá-la para as condições do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS. Durante este estudo, 1.123 estruturas foram reconstruídas em diferentes condições, sendo que 95 blastocistos foram produzidos em 56 replicações. O primeiro blastocisto foi produzido na 5ª rotina. Após a transferência de parte destes embriões, 13 prenhez foram estabelecidas, entretanto, a maioria delas foi interrompida no terço inicial da gestação. Uma prenhez gemelar alcançou 260 dias, momento em que os fetos foram abortados. Outra gestação foi a termo, com o nascimento de um clone vivo, porém, o animal veio a óbito 42 horas após o nascimento.

Descritores: transferência nuclear, bovinos, embriões, clones.

ABSTRACT

The nuclear transfer technique is a tool that makes possible the production of embryos clones that can be used to provide the birth of identical animals or as model for the study of several physiologic mechanisms, during the embryonic development. In this way, bovine embryos clones were produced by nuclear transfer with the objective of establishing the cloning technique, as well as to optimize it at the conditions of routine work at the Laboratory of Embryology and Biotechnics of Reproduction of UFRGS. During this work, 1.123 structures were reconstructed in different conditions, and 95 blastocysts were produced, in 56 replicate procedures. The first blastocyst was produced in the 5th routine. After the transfer of part of these embryos, 13 pregnancies were established, however, most of them was lost at the beginning of pregnancy. A twin pregnancy reached 260 days, however the fetuses were miscarried. Another gestation was to term, with the birth by Cesarian of an alive clone, however the animal came to death 42 hours after the birth.

Key words: nuclear transfer, bovine, embryos, clones.

INTRODUÇÃO

A técnica de transferência nuclear (NT) de célula somática tem interessado à comunidade científica há muitos anos. A clonagem reprodutiva é uma ferramenta que possibilita a produção de indivíduos idênticos, todavia, a sua eficiência ainda é muito baixa, especialmente quando analisamos os resultados obtidos *in vivo* [13]. Apesar dos avanços que vêm sendo alcançados nas técnicas de NT para a produção de animais clones, não existe um consenso entre os diferentes protocolos. Mesmo quando experimentos são realizados em condições idênticas, o protocolo que é melhor para um tipo celular pode não funcionar adequadamente para outro [25]. Além disso, diferenças observadas nos resultados alcançados com diferentes metodologias podem ser atribuídas aos métodos estatísticos utilizados [7]. Isto pode ser observado quando pesquisadores tentaram repetir o primeiro experimento que relatou o nascimento de camundongos produzidos por NT [16], sem obter sucesso, questionando inclusive a veracidade dos dados e afirmando que a técnica era impossível de ser executada em mamíferos [18,19,21]. Desta maneira, a implementação desta técnica em um determinado laboratório não requer apenas execução de um protocolo, mas sim a sua otimização em condições específicas. Assim sendo, o objetivo dos experimentos foi estabelecer um protocolo prático e eficiente para a produção de embriões por transferência nuclear.

MATERIAIS E MÉTODOS

Meios de cultivo

A água utilizada para a preparação de todos os meios de cultivo era estéril e apirogênica, obtida por ultrafiltração através de equipamento de purificação de água Milli-Q Synthesis (Millipore, Bedford, MA, EUA), com operação e manutenção seguidos conforme especificação do fabricante. Os reagentes utilizados eram Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), sendo que as outras fontes estão especificadas no texto.

Obtenção e cultivo das células doadoras de núcleo

Os fibroblastos bovinos foram obtidos por explantação a partir de fragmentos de ovário recuperados após o *slicing*. Células do *cumulus oophorus* bovinas foram obtidas após a aspiração folicular guiada por ultrassonografia. As células-tronco oriundas de

tecido adiposo foram fornecidas pela BIO-Biotecnologia Animal (Brasília, DF, Brasil). As células foram cultivadas em meio DMEM [14] até terceira ou quarta passagens e congeladas em uma solução contendo 10% de etilenoglicol (EG) em soro fetal bovino (SFB, Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Para o congelamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspenas em SFB. Foi adicionado EG de maneira que a concentração final ficasse em 10%. As células foram então envasadas em palhetas de 0,5 mL e colocadas sob refrigeração 4°C durante 1h. Após este período, as palhetas foram transferidas para vapor de N₂L durante 15min e, em seguida, imersas em N₂L. As palhetas foram armazenadas em botijões criogênicos até serem descongeladas 3-5 dias antes da utilização, quando apresentavam confluência de 90%. No momento do uso, as placas foram tripsinizadas e as células ressuspenas em meio SOF [10] tamponado com HEPES (HSOF), contendo 20,0 mM de HEPES (H6147) e suplementado com 2 mg/mL BSA (Gibco-BRL, 11018-017).

Coleta e obtenção dos oócitos bovinos

Os ovários bovinos foram colhidos em abatedouro, imediatamente após o abate das vacas, e transportados até o laboratório em recipiente térmico contendo solução fisiológica a 35°C. Os complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) foram obtidos por escarificação do córtex ovariano (*slicing*) em PBS – Dulbecco's. Os CCOs foram selecionados e mantidos em meio TCM-HEPES contendo 50 µg/mL gentamicina (G1264), 0,2 mM piruvato de sódio (P4562), 2,4 mM NaHCO₃ (S5761) suplementado com 1 mg/mL de BSA (Gibco-BRL, 11018-017) até o momento da maturação.

Maturação *in vitro*, desnudamento e seleção dos oócitos para micromanipulação

Os oócitos eram maturados em grupos de 35-40 por poço, contendo 500 µL de meio TCM-Maturação [22], composto por TCM199 (M2520) suplementado com 50 µg/mL gentamicina (G1264), 0,2 mM piruvato de sódio (P4562), 26 mM NaHCO₃ (S5761), 0,5 µg/mL FSH (Folltropin, Vetrepharm, Belleville, ON, Canadá), 0,03 UI/mL hCG (Profasi, Serono, Brasil), 1 µg/mL estradiol (E8875) e 10% de soro inativado de vaca em estro, durante 17 horas a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Após o final da maturação, os CCOs eram transferidos para meio HSOF onde as células do *cumulus oophorus* eram removidas por pipetagem.

As estruturas eram transferidas para gotas do mesmo meio, sob óleo mineral (M8410), sobre mesa aquecedora a 37°C, onde permaneciam até o final do processo (aproximadamente 7 horas). Foram selecionados apenas oócitos que apresentavam corpúsculo polar e citoplasma com aspecto homogêneo.

Produção de embriões por transferência nuclear (NT)

Os oócitos selecionados foram submetidos à enucleação por micromanipulação. Para isto, os oócitos eram incubados durante 15 minutos em HSOF suplementado com 7,5 µg/mL de citocalasina B (C6762) e 5,0 µg/mL de Hoechst 33342 (B2883).

As pipetas de micromanipulação foram produzidas no laboratório. As pipetas *holding* foram produzidas a partir de capilares de vidro de 1,5 mm de diâmetro externo (Perfecta®, São Paulo, Brasil), esticadas manualmente em chama e as bordas arredondadas com calor na microforja MF-90 (Nari-shige®, Tóquio, Japão), de maneira que ficassem com aproximadamente 120 µm de diâmetro externo e 40 µm de diâmetro interno. As pipetas de enucleação e transferência da célula foram confeccionadas a partir de capilares de vidro de borossilicato de 1,0 mm de diâmetro MTW100-4 (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EUA). Os capilares foram esticados no *puller* P-97 (Sutter Instruments Co. Novato, CA, EUA), cortados na microforja MF-90 (Narishige®, Tóquio, Japão) e lixados na *microgrinder* EG-40 (Narishige®, Tóquio, Japão) de maneira que ficassem com 15 a 20 µm de diâmetro interno e um bisel de 45°. Os oócitos eram contidos com uma pipeta *holding* e, com o auxílio de uma pipeta de enucleação de 25 µm de diâmetro, a placa metafásica e o corpúsculo polar eram removidos. A enucleação foi realizada sob microscópio óptico Axiovert 135 (Carl Zeiss®, Jena, Alemanha), equipado com sistema de epi-fluorescência (luz UV e filtro G365) e micro-manipulador Zeiss, onde foram visualizados e removidos o corpúsculo polar e a placa metafásica.

As células doadoras dos núcleos foram transferidas para o espaço perivitelino dos oócitos bovinos enucleados, através de micromanipulação, em HSOF com 7,5 µg/mL de citocalasina B (C6762).

Os complexos reconstruídos (CR, célula doadora-citoplasma receptor) foram fusionados com o auxílio de eletrodos acoplados a um sistema de micromanipulação sob estereomicroscópio. Para a fusão, os CR eram transferidos para placa contendo 1 mL de meio de

fusão, sob óleo mineral, e posicionados de maneira que a célula doadora e o citoplasma receptor ficassem em linha com os eletrodos. A corrente elétrica aplicada foi de 20 mV durante 45 µs, utilizando o equipamento de eletrofusão ECM 2001 (BTX, Holliston, MA, USA). O meio de fusão era composto de 0,25 M manitol (M1902), 0,1 mM MgSO₄ (M2643) e 0,5 mg/mL BSA (Gibco-BRL, 11018-017), com osmolaridade de 260 mOsm. Após a fusão, os CR eram transferidos para o HSOF e a avaliação da taxa de fusão era realizada 30min após a eletrofusão. Os complexos CRs que não fusionaram eram submetidos a uma segunda descarga elétrica de mesma intensidade e duração.

Os complexos reconstruídos foram ativados quimicamente 45 a 90min após receberem o estímulo para a fusão. Foram utilizados dois protocolos de ativação denominados DMAP e CHX. Em ambos os protocolos, a ativação inicial foi realizada através da incubação em 5 µM de ionomicina (I0634) em HSOF. No protocolo DMAP, subsequentemente, os complexos reconstruídos foram incubados durante 3h30min em meio SOF suplementado com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP, D2629). Ao passo que no protocolo CHX, os complexos reconstruídos foram incubados durante 5h em meio SOF, suplementado com 10 µg/mL ciclohexamida (CHX) e 2,5 µg/ml citocalasina D (C8273). Todo o procedimento de ativação foi realizado a 37°C, sendo que a ativação inicial com ionomicina foi realizada em atmosfera ambiente, e a ativação subsequente, tanto no protocolo DMAP como no CHX, foi realizada com 5% de CO₂ em ar.

Ativação partenogenética (AP)

Inicialmente, embriões partenogenéticos foram utilizados como modelo para comparar os meios TCM-HEPES e HSOF utilizados para a manipulação das estruturas durante todo o procedimento de transferência nuclear. Para este experimento, oócitos bovinos maturados *in vitro* e selecionados para a micromanipulação foram mantidos em gotas dos respectivos meios, sob óleo mineral sobre mesa térmica, durante 7 horas. Após este período, os oócitos foram ativados quimicamente e os embriões foram cultivados em meio SOF+SVE.

Em todas as rotinas de transferência nuclear, um grupo de oócitos foi mantido nas mesmas condições que os complexos reconstruídos durante o procedimento. Ao final do processo foram ativados quimicamente e,

estes embriões partenogênicos, foram cultivados nas mesmas condições que os embriões NT bovinos. Os embriões partenogênicos foram considerados como controle das condições de manipulação, ativação e cultivo para os grupos NT.

Cultivo *in vitro*

Os embriões foram cultivados em meio SOF [10] modificado suplementado com 4 mg/mL de BSA (Gibco-BRL, 11018-017) ou 10% de SVE, em gotas de 80 µL sob óleo mineral (M8410), a 39°C, com 100% de umidade relativa, 5% de CO₂, 5% de O₂ em N₂.

Avaliação do desenvolvimento *in vitro*

A taxa de clivagem foi observada 48 horas após o início do CIV, e a taxa de blastocisto foi determinada no 7º e 8º dia, considerando o momento da ativação como Dia 0.

Vitrificação, reaquecimento e transferência dos embriões produzidos por transferência nuclear

Os embriões foram vitrificados em pipetas de vidro e reaquecidos de acordo com protocolo descrito anteriormente [27]. As pipetas de vidro eram armazenadas dentro de palhetas de 0,5 mL em botijões criogênicos até o dia da transferência. Os embriões foram transferidos diretamente para receptoras síncronas, por via cervical, sem avaliação morfológica (transferência direta).

Análise estatística

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

RESULTADOS

Comparação entre meios de manipulação utilizados durante as etapas da clonagem

Neste experimento, foi avaliado o efeito de dois meios diferentes de manutenção em atmosfera ambiente (TCM-HEPES ou HSOF).

As taxas de desenvolvimento *in vitro* de oócitos mantidos em TCM-HEPES ou HSOF em atmosfera ambiente, antes da ativação partenogênica, estão sumarizadas na Tabela 1.

A partir destes dados, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando o HSOF como meio de manutenção padrão.

Otimização do sistema de ativação química em embriões clones

Complexos reconstruídos com células do *cumulus* de um único bovino foram ativados partenogênicamente com ionomicina durante 5 min e, subsequentemente, com CHX ou DMAP e cultivados com SOF+SVE. As taxas de clivagem (60,8% VS 64,7%) e de blastocisto (26,2% VS 11,8%), não diferiram significativamente entre os grupos CHX (n=23) e DMAP (n=85) em três repetições. O protocolo do DMAP foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Efeito da fonte protéica no meio de cultivo SOF para embriões NTSC

Embriões NTSC bovino foram obtidos de fibroblastos de um único animal doador, e cultivados em meio SOF suplementado com 10% de SVE, ou 4 mg/mL de BSA. O efeito da fonte protéica foi determinado através das taxas de clivagem e blastocistos ao

Tabela 1. Taxas de desenvolvimento *in vitro* de oócitos ativados partenogênicamente, após manutenção durante 7 horas sobre mesa térmica em TCM-HEPES ou HSOF.

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

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

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões NTSC cultivados em meio SOF suplementado com SVE ou BSA.

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

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

Tabela 3. Taxa de desenvolvimento *in vivo* de embriões clones obtidos a partir de três tipos celulares e animais diferentes.

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

longo de 10 repetições. As taxas de desenvolvimento embrionário dos embriões estão apresentadas na Tabela 2.

Efeito do genótipo e do tecido da célula doadora de núcleo para embriões NT

Embriões foram reconstruídos utilizando fibroblastos bovinos oriundos de dois animais, um Angus (n=213) e o outro Holandês (n=41). O efeito do genótipo doador não proporcionou diferença significativa sobre as taxas de clivagem (69,1% e 63,4%) nem sobre as taxas de blastocisto (14,5% e 19,5%).

Efeito do tipo celular utilizado como célula doadora oriunda de animais diferentes sobre o desenvolvimento *in vivo*

Foram utilizadas células do *cumulus*, fibroblastos e células tronco de tecido adiposo como doador de núcleo, de três animais diferentes. As taxas de desenvolvimento *in vivo* estão apresentadas na Tabela 3.

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

Alguns embriões, produzidos ao longo dos experimentos anteriores, foram vitrificados e transferidos para receptoras, ou transferidos a fresco, com objetivo de avaliar a capacidade de desenvolvimento *in vivo* de acordo com a disponibilidade de receptoras. As taxas de prenhez aos 35 dias foram de 46,1% (6/13) para os embriões frescos e 63,6% (7/11) para os embriões vitrificados.

Avaliação do desenvolvimento perinatal

Uma gestação gemelar alcançou 260 dias de prenhez após a transferência de um único blastocisto em eclosão. Os fetos abortados foram encontrados no campo. A análise do DNA microsatélite dos fetos, da doadora da célula e da receptora confirmou a identidade dos animais. Os fetos foram necropsiados e não apresentavam alteração macroscópicas ou histo-patológicas.

Outra gestação chegou a termo com o nascimento de um clone da raça nelore (Figura 1). O animal nasceu com 25kg, aos 292 dias de gestação, por cesariana. Os cuidados neonatais foram intensivos e incluíram administração do colostro, manutenção da temperatura corporal, oxigenioterapia, administração de surfactante pulmonar e fármacos, que objetivavam a melhora das condições clínicas, tais como amino-filina, glicose, albumina e dexametasona. A evolução do quadro clínico do animal era realizada através do exame clínico constante, a hemogasometria arterial e venosa, hemograma, bioquímica sanguínea, EQU, radiografia e ecografia. Entretanto, o animal veio a óbito 42 duas horas após o nascimento, por insuficiência respiratória. O animal também apresentou hipoalbuminemia severa, degeneração gordurosa hepática, úraco persistente.

DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo estabelecer as condições da técnica de clonagem por transferência nuclear que possibilitassem a produção de blastocistos



Figura 1. Neonato clone de animal Nelore com 15h de vida.

e de prenhez. Inicialmente, as condições de fusão foram estabelecidas, testando-se diversos parâmetros, obtendo-se resultados entre 90 e 95% de fusão (dados não mostrados). Assim como é empregado em diversos protocolos [2,13,29], inicialmente, foi utilizada hialuronidase para a remoção das células do *cumulus* antes da clonagem. Entretanto, nós observamos que as células eram facilmente removidas por pipetagem, quando o período de maturação não excedia 17h e o meio utilizado era o HSOF, o que dispensou o uso de hialuronidase, diferentemente do que ocorria quando era utilizado o TCM-HEPES como meio de manipulação. Este dado, juntamente com as taxas de desenvolvimento *in vitro* observadas (Tabela 1), conduziu-nos a utilizá-lo como meio de eleição para a manipulação em atmosfera ambiente.

Tanto o 6DMAP como a CHX são empregados amplamente nos protocolos de ativação descritos na literatura [6,7,26,28]. Nas nossas condições, não houve diferença significativa entre os dois protocolos de ativação sobre as taxas de desenvolvimento *in vitro*, corroborando dados observados na literatura [3,15]. Entretanto, devido ao 6DMAP ser um inibidor de proteínquinase, este promove uma inibição mais específica do que a CHX, que é um inibidor da síntese protéica [1]. Assim, o 6DMAP foi empregado como protocolo padrão de ativação. Além disto, outra facilidade prática é a necessidade de menor tempo de incubação (3h e 30min) do que a CHX, que necessita de 5h [9,26].

Os sistemas para o cultivo de embriões clones vêm sendo pouco estudados, existindo reduzidos relatos neste sentido e, muitas vezes, os grupos de pesquisa utilizam, para estes embriões, os sistemas anteriormente

otimizados para embriões FIV [5]. Entretanto, esses embriões apresentam características distintas e provavelmente devem ter exigências metabólicas diferentes. Isto pode ser observado quando autores comparam o desenvolvimento de embriões FIV e NT cultivados na presença ou ausência de fonte protéica, e observaram que a ausência de proteína no meio de cultivo não alterou as taxas de blastocisto em embriões FIV, diferente do que foi observado com embriões NT, onde houve redução nesta taxa na ausência de proteína [4]. De maneira semelhante, em experimentos anteriores, realizados com embriões FIV nas nossas condições, conseguimos produzir embriões com taxas semelhantes de desenvolvimento *in vitro* até blastocisto, quando utilizamos SOF suplementado com BSA ou SVE [10]. Entretanto, para os embriões clones, o uso da BSA proporcionou taxas de desenvolvimento *in vitro* até blastocisto significativamente menores do que o SVE (Tabela 2). Isto corrobora dados da literatura, onde melhores taxas de blastocisto foram observadas quando o meio foi suplementado com soro no decorrer do cultivo, em comparação ao meio suplementado apenas com BSA ou PVA [8]. Em função de serem produzidos por metodologia mais complexa, e tendo que reprogramar um núcleo exógeno, talvez não suportem injúrias proporcionadas por condições subótimas de cultivo *in vitro* que os embriões FIV possam tolerar, resultando em menores taxas de desenvolvimento *in vitro*.

Em relação à origem da célula doadora, não observamos diferença significativa nas taxas de desenvolvimento *in vitro*, quando utilizamos diferentes doadores de células e/ou diferentes tecidos doados pelo mesmo animal (Tabela 3). Alguns tipos celulares parecem ser mais facilmente reprogramados do que outros, entretanto, a comparação entre os experimentos que utilizam diferentes tipos de células não é aconselhável, devido aos métodos utilizados serem diferentes e a reduzida eficiência geral da técnica [7,20]. De um modo geral, acredita-se que a eficiência da clonagem é inversamente proporcional ao estado de diferenciação da célula somática. Entretanto, estudo utilizando células da linhagem muscular em diferentes estágios de diferenciação, não apresentou diferença nas taxas de prenhez e de sobrevivência pós-natal [12]. Neste trabalho, utilizamos células tronco de tecido adiposo, que são teoricamente menos diferenciadas quando comparadas às células do *cumulus* e fibroblastos. Apesar da eficiência *in vivo* ter sido relativamente alta (20% de nascimentos dos embriões transferidos), o animal

nascido apresentou patologias que foram incompatíveis com a vida extra-uterina. Desta maneira, o potencial de reprogramação da célula somática pode ser dependente do método estatístico utilizado para realizar a comparação, e qualquer afirmação em relação ao melhor tipo celular é difícil de ser realizada [7].

Os processos que envolvem a produção de animais, a partir de transferência nuclear, preferencialmente usam embriões frescos [23-25], o que acaba sendo mais uma dificuldade para a implementação a campo, uma vez que se faz necessária a disponibilidade de receptoras síncronas e relativamente próximas. Em nossos experimentos, alguns embriões foram transferidos a fresco, enquanto outros após vitrificação, com taxas iniciais de prenhez de 46,1% (n=13) e 63,6% (n=11), respectivamente, e, uma gestação gemelar de embrião vitrificado, alcançou 260 dias. Quando analisamos os dados da literatura, observamos que as taxas de sucesso da criopreservação destes embriões é muito variável, e alguns autores obtiveram boas taxas de sobrevivência *in vitro* após a vitrificação (77%), mas nenhuma gestação 60 dias após a transferência (N=25)

[17], enquanto outros autores, mesmo transferindo um menor número de embriões (N=9), obtiveram o nascimento de um produto [11]. Tendo em vista a eficiência da técnica, que por si só já é muito baixa, e o pequeno número de trabalhos publicados neste sentido, a otimização destes procedimentos de criopreservação para embriões NT se faz necessária, pois pode representar uma boa alternativa, podendo-se concentrar as transferências destes embriões temporal e espacialmente.

Desta maneira, nosso objetivo principal, que era de produzir embriões transferíveis, foi alcançado através da implementação da técnica e otimização das condições. Além disso, conseguimos estabelecer prenhez que puderam ser levadas a termo, inclusive com o nascimento de um produto.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento parcial deste projeto, através de bolsa de mestrado, doutorado e produtividade de pesquisa concedidas. Os autores também agradecem ao Prof. Dr. Eduardo Birgel Jr. da FMVZ/USP pelo atendimento clínico prestado ao clone nascido, e ao Prof. Dr. David Driemeier, equipe Setor de Patologia da FAVET/UFRGS, pelo diagnóstico *pos mortem* dos clones e à BIO-Biotecnologia Animal pelo fornecimento das células.

REFERÊNCIAS

- 1 Alberio R., Zakhartchenko V., Motlik J. & Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *The International Journal of Developmental Biology*. 45: 797-809.
- 2 Atabay E.C., Takahashi Y., Katagiri S., Nagano M., Koga A. & Kanai Y. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology*. 61: 15-23.
- 3 Bhak J.S., Lee S.L., Ock S.A., Mohana kumar B., Choe S.Y. & Rho G.J. 2006. Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. *Animal Reproduction Science*. 92: 37-49.
- 4 Bhuiyan M.M.U., Cho J.K., Jang G., Park E.S., Kang S.K., Lee B.C. & Hwang W.S. 2004. Effect of protein supplementation in potassium simplex optimization medium on preimplantation development of bovine non-transgenic and transgenic cloned embryos. *Theriogenology*. 62: 1403-1416.
- 5 Bhuiyana M.M.U., Kanga S.K. & Leea B.C. 2007. Supplementation of fructose in chemically defined protein-free medium enhances the *in vitro* development of bovine transgenic cloned embryos. *Zygote*. 15: 189-198.
- 6 Booth P.J., Holm P., Vajta G., Greve T. & Callesen H. 2001. Effect of two activation treatments and age of blastomere karyoplasts on *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 60: 377-383.
- 7 Campbell K.H.S., Fisher P., Chen W.C., Choi I., Kelly R.D.W., Lee J.H. & Xhu J. 2007. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*. 68: S214-S231.
- 8 Choi Y.H., Lee B.C., Lim J.M., Kang S.K. & Hwang W.S. 2002. Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. *Theriogenology*. 58: 1187-1197.
- 9 Forell F., Feltrin C., Vieira A.D., Antonioli C.B. & Rodrigues J.L. 2004. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using cytochalasin B or D in association with cycloheximide. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 143.
- 10 Forell F., Oliveira A.T.D., Lopes R.F.F. & Rodrigues J.L. 2004. Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio SOF com SVE ou BSA. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41: 396-403.
- 11 Gong G., Dai Y., Fan B., Zhu H., Zhu S., Wang H., Wang L., Tang B., Li R., Wan R., Liu Y., Huang Y., Zhang L., Sun X. & Li N. 2004. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*. 69: 278-288.

- 12 Green A.L., Wells D.N. & Oback B. 2007. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. *Biology of Reproduction*. 77: 395-406.
- 13 Heyman Y., Chavatte-Palmer P., LeBourhis D., Camous S., Vignon X. & Renard J.P. 2002. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. *Biology of Reproduction*. 66: 6-13.
- 14 Höllker M., Petersen B., Hassel P., Kues W.A., Lemme E., Lucas-Hahn A. & Niemann H. 2005. Duration of In Vitro Maturation of Recipient Oocytes Affects Blastocyst Development of Cloned Porcine Embryos. *Cloning and Stem Cells*. 7: 35-44.
- 15 Ikumi S., Asada M., Sawai K. & Fukui Y. 2003. Effect of Activation Methods for Bovine Oocytes after Intracytoplasmic Injection. *Journal of Reproduction and Development*. 49: 37-43.
- 16 Illmensee K. & Hoppe P.C. 1981. Nuclear transplantation in mus musculus: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*. 23: 9-18.
- 17 Laowtammathron C., Lorthongpanich C., Ketudat-Cairns M., Hochi S. & Parnpai R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. 64: 1185-1196.
- 18 Marx J.L. 1983. Bar Harbor investigation reveals no fraud. *Science*. 220: 1254.
- 19 Marx J.L. 1983. Swiss research questioned. *Science*. 220: 1023.
- 20 Miyoshi K., Rzucidlo S.J., Pratt S.L. & Stice S.L. 2003. Improvements in Cloning Efficiencies May Be Possible by Increasing Uniformity in Recipient Oocytes and Donor Cells. *Biology of Reproduction*. 68: 1079-1086.
- 21 Newmark P. 1983. Geneva and Bar Harbor labs to check results. *Nature*. 303: 363.
- 22 Oliveira A.T.D., Lopes R.F.F. & Rodrigues J.L. 2005. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. *Theriogenology*. 64: 1559-1572.
- 23 Pace M.M., Augenstein M.L., Betthausen 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. 2002. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biology of Reproduction*. 67: 334-9.
- 24 Panarace M., Aguero J.L., Garrote M., Jauregui G., Segovia A., Cane L., Gutierrez J., Marfil M., Rigali F., Pugliese M., Young S., Lagioia J., Garnil C., Forte Pontes J.E., Ereno Junio J.C., Mower S. & Medina M. 2007. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*. 67: 142-151.
- 25 Powell A.M., Talbot N.C., Wells K.D., Kerr D.E., Pursel V.G. & Wall R.J. 2004. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*. 71: 210-6.
- 26 Shen P.C., Lee S.N., Liu B.T., Chu F.H., Wang C.H., Wu J.S., Lin H.H. & Cheng W.T.K. 2008. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 106: 1-12.
- 27 Vieira A.D., Forell F., Feltrin C. & Rodrigues J.L. 2007. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. *Animal Reproduction Science*. 99: 377-383.
- 28 Wang Z.G., Wang W., Yu S.D. & Xu Z.R. 2008. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Animal Reproduction Science*. 105: 292-301.
- 29 Wells D.N., Misica P.M. & Tervit H.R. 1999. Production of Cloned Calves Following Nuclear Transfer with Cultured Adult Mural Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*. 60: 996-1005.