

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

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MICROPOÇOS
PARA EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS
POR HANDMADE CLONING (HMC)**

Autor: Cristiano Feltrin

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

Orientador: José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2010

Cristiano Feltrin

AVALIAÇÃO DE DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*
(MICROPOÇOS) PARA EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS POR HANDMADE
CLONING (HMC)

APROVADO POR:

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

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

Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Membro da Comissão – UFCSPA

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

AGRADECIMENTOS

A Deus que tem me proporcionado tantos motivos para agradecer e continuar vivendo com alegria e paz.

Ao Professor Dr. José Luiz Rodrigues, o qual tem proporcionado não só meu crescimento profissional, mas também meu crescimento pessoal, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais que estiveram sempre ao meu lado permitindo que este sonho se concretizasse, além de terem dedicado suas vidas amando e educando a mim e aos meus irmãos.

A mulher da minha vida, Malu, que me incentiva em todos os momentos e tem trazido tantas alegrias ao meu viver.

A família Vasconcellos que proporcionou a realização de todos os meus sonhos e tem me ensinado o verdadeiro significado do amor e da amizade.

Aos meus irmãos, Andy e Me, e a minha avó, Zoraide, que sempre vibraram com cada conquista alcançada.

A Fabiana Forell, minha amiga e companheira de tantas jornadas.

Aos meus amigos e colegas de profissão, Andréia, Natália, Artur, Rui, Alecsandra e Marcelo Bertolini, os quais me ensinaram a trabalhar em grupo com humildade e amizade acima de tudo.

A toda equipe do laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS.

Ao meu sogro e sogra, Sérgio e Liane, e meus cunhados, Aline, Sandrinho e Alex, que me apoiaram e proporcionaram um ambiente de paz e tranquilidade para o estudo.

A Bio Biotecnologia Animal por todo o apoio na realização deste trabalho.

RESUMO

Sistemas de produção *in vitro* de embriões mamíferos muitas vezes requerem que o cultivo embrionário seja realizado de forma individualizada. Entretanto, os resultados obtidos com o cultivo *in vitro* (CIV) individual são inconstantes e, por vezes, inferiores ao CIV em grupo. Entre os sistemas que requerem o CIV individual, a técnica de *handmade cloning* (HMC) se destaca por produzir embriões sem zona pelúcida que não podem ser cultivados agrupados em protocolos convencionais de CIV. O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos clonados pela técnica de HMC e submetidos a três diferentes sistemas de CIV em micropoços (Well of the well – WOW), sendo um industrial, confeccionado em polidimetilsiloxano (PDMS), que visou à padronização da configuração do sistema de CIV. Após 11 replicações, de 3.876 complexos *cumuli*-oócito bovinos maturados *in vitro*, 3.437 (88,6%) oócitos apresentaram a extrusão do 1º corpúsculo polar. Após a digestão da zona pelúcida, 2.992 estruturas foram bisseccionadas manualmente, com a produção de 2.288 hemi-citoplastos. Reconstruíram-se 1.011 embriões pela adesão de dois hemi-citoplastos a uma célula somática (célula-tronco mesenquimal bovina de uma fêmea adulta da raça Nelore), dos quais 751 (74,2%) embriões fusionaram após eletrofusão, sendo 715 ativados quimicamente. Os embriões clonados (n=705) foram então alocados aleatoriamente em três grupos experimentais para o CIV: Grupo 1 (G1) – micropoço modificado (WOW-modificado, FELTRIN *et al.*, 2006a); Grupo 2 (G2) – micropoço convencional (WOW-convencional, VATJA *et al.*, 2000); e Grupo 3 (G3) – micropoço – PDMS (WOW-PDMS). Como grupo controle (FIV, Grupo 4, G4), 594 oócitos foram colocados em maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, em paralelo aos grupos clonados. Os resultados das taxas de clivagem no Dia 2, de blastocisto no Dia 7 e de prenhez no Dia 30 de desenvolvimento foram analisados pelo teste do χ^2 com nível de significância de 5%. Não houve diferença significativa quanto à taxa de clivagem nos diferentes grupos. Entretanto, a taxa de blastocisto (BL) no G1 (99/239; 41,4%) foi significativamente superior à observada no G2 (72/232; 31,0%) e no G3 (68/234; 29,1%), sendo estas últimas semelhantes entre si. A taxa de BL do grupo controle (315/594; 53,0%) foi superior aos três grupos experimentais. Finalmente, o desenvolvimento *in vivo* até o Dia 30 de prenhez não diferiu entre os grupos G1 (7/15; 46,7%), G2 (7/13; 53,9%) e G3 (6/16; 50,0%). O sistema em micropoço modificado promoveu melhores condições de CIV a embriões clonados por HMC, traduzido por maiores taxas de BL, não se refletindo, entretanto, em diferenças no desenvolvimento *in vivo* subsequente à transferência para fêmeas receptoras.

Palavras-chaves: *handmade cloning* (HMC), *well-of-the-well* (WOW), cultivo *in vitro* (CIV), PDMS.

ABSTRACT

In vitro production systems for mammalian embryos quite often require embryos to be cultured individually. However, results obtained after individual embryo *in vitro* culture (IVC) are frequently inconsistent and inferior to IVC in groups. The Handmade Cloning (HMC) procedure is among the systems that require individual IVC, since zona-free embryos cannot be grouped for culture by standard IVC protocols. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* development of bovine embryos cloned by HMC, after the IVC in three distinct microwell arrangements, including an industrial chip, manufactured in polydimethylsiloxane (PDMS), which aimed to standardize the pattern of the IVC system. After 11 replications, 3,437 (88.6%) oocytes were selected based on the extrusion of the first polar body, out of 3,876 *in vitro*-matured bovine cumuli-oocyte complexes. Following zona pellucida digestion, 2,992 structures were manually bisected, generating 2,288 hemi-cytoplasts. A total of 1,011 embryos were reconstructed by the adhesion of two hemi-cytoplasts to a somatic cell (bovine mesenchymal stem cells from an adult Nelore female), with 751 fusing (74.2%) following electrofusion, and 715 being chemically activated. Cloned embryos ($n=705$) were then randomly allocated to one of three IVC experimental groups: Group 1 (G1) – modified microwells (FELTRIN et al., 2006a); Group 2 (G2) – conventional microwells (VATJA et al., 2000); and Group 3 (G3) – microwells in PDMS. As control group (IVF, Group 4, G4), 594 oocytes were *in vitro*-matured, fertilized and cultured in parallel to the cloned groups. Cleavage, blastocyst and pregnancy rates evaluated on Days 2, 7 and 30 of development were analyzed by the χ^2 test, for a significance level of 5%. No differences in cleavage rates were observed between groups. However, blastocyst rates in G1 (99/239; 41.4%) were significantly higher than in G2 (72/232; 31.0%) and in G3 (68/234; 29.1%), which did not differ between one another. Blastocyst rates in the IVF control group (315/594; 53.0%) were in turn higher than in all cloned experimental groups. Finally, *in vivo* development to Day 30 of pregnancy was not different between G1 (7/15; 46.7%), G2 (7/13; 53.9%) and G3 (6/16; 50.0%). In summary, the modified microwell system promoted superior development to the blastocyst stage than both the conventional and the DMPS-based microwell systems, with no impact on the subsequent *in vivo* development after transfer to female recipients.

Keywords: handmade cloning (HMC), well-of-the-well (WOW), *in vitro* culture (IVC), PDMS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nódulos de cálcio. Magnitude: 200X.....	26
Figura 2 – Nódulo de cálcio corado pelo nitrato de prata (200X).....	27
Figura 3 – No detalhe, nódulo de cálcio corado com alizarina (200X).....	27
Figura 4 – (A) Reconstrução dos hemi-citoplastos com a CTM antes da eletrofusão das membranas. (B) Estruturas em reorganização, após a fusão.....	31
Figura 5 – (A) No detalhe, estrutura reconstruída no sistema WOW modificado. (B) No detalhe, estrutura no sistema WOW (well-of-the-well) convencional.....	32
Figura 6 – Visão externa do dispositivo WOW (well-of-the-well) – PDMS.....	33
Figura 7 – (A) Visão geral do WOW (well-of-the-well) – PDMS (10X). (B) Estruturas reconstruídas no interior dos micropoços (20X).....	33
Figura 8 – No detalhe, embriões no interior dos micropoços no sistema WOW (well-of-the-well) -PDMS.....	35
Figura 9 – (A) Clivagem em micropoço no sistema WOW (<i>well-of-the-well</i>) convencional. (B) Clivagem no sistema WOW modificado.....	38
Figura 10 – Estruturas clivadas no interior dos microcanais.....	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Taxas de desenvolvimento de embriões FIV e clonados cultivados em diferentes sistemas de cultivo.....34
- Tabela 2. Taxas de prenhez no Dia 30 de gestação obtidas após a transferência de embriões bovinos clonados produzidos em diferentes sistemas de cultivo in vitro.....35
- Tabela 3. Eficiência relativa (ER) dos diferentes sistemas de cultivo in vitro quanto à produção de blastocistos ou estabelecimento de prenhez pelo número total de oócitos utilizados para a produção in vitro de embriões bovinos por HMC ou por FIV.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrometro(s)
µM	micromolar(s)
µs	microsegundo(s)
°	grau(s)
°C	grau(s) Celsius
6DMAP	dimetilaminopurina
bFGF	fator de crescimento fibroblástico bovino
BL	blastocisto
BSA	albumina sérica bovina
CCO	complexo <i>cumulus oophorus</i>
CCOs	complexos <i>cumuli oophorus</i>
CB	citocalasina B
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
EGF	fator de crescimento epidérmico
IGF I e II	fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama(s)
GO	<i>Glass Oviduct</i>
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HC-CD	hemicitoplastos e células doadoras
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HMC	<i>handmade cloning</i>
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
LH	hormônio luteinizante

LOS	Síndrome do Terneiro Absolutamente Grande
M	molar
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar(s)
mV	milivolt(s)
N ₂ L	nitrogênio líquido
NT	transferência nuclear
NTSC	transferência nuclear de células somáticas
O ₂	oxigênio
OPU	<i>ovum Pick Up</i>
PB	corpúsculo polar
PDMS	polímero polidimetilsiloxano
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
PIV	produção <i>in vitro</i> de embriões
s	segundo(s)
SFB	soro fetal bovino
SOF	<i>synthetic oviduct fluid</i>
TCM	<i>tissue culture medium</i>
vs	versus
WOW	<i>well-of-the-well</i>
ZP	zona pelúcida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Clonagem Animal por Transferência Nuclear (TN).....	16
2.2 Células Doadoras de Núcleo.....	18
2.3 Handmade Cloning e Cultivos Embrionários in vitro	20
2.4 Sistemas de Microfluidos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Meios e Reagentes.....	24
3.2 Isolamento e Diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTM) bovinas de origem adiposa.....	24
3.2.1 Congelamento das Células.....	25
3.2.2 Descongelamento das Células.....	25
3.3 Protocolo de diferenciação osteogênico.....	26
3.3.1 Coloração de Von Kossa.....	26
3.3.2 Coloração de Alizarina.....	27
3.4 Clonagem por handmade cloning (HMC).....	28
3.4.1 Obtenção e Seleção de Oócitos Bovinos.....	28
3.4.2 Preparo dos Oócitos.....	28
3.4.3 Digestão da Zona Pelúcida.....	29
3.4.4 Bisseção dos Oócitos.....	29
3.4.5 Preparo Das Células Doadoras De Núcleo.....	29
3.4.6 Reconstrução.....	30
3.4.7 Eletrofusão.....	30
3.4.8 Ativação.....	31
3.4.9 FIV.....	31
3.5 Preparação de Micropoços e CIV.....	32
3.6 Análise dos Dados.....	33
4 RESULTADOS.....	34
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	43
7 PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A embriologia experimental evoluiu de forma singular nos últimos anos. Entretanto, o conhecimento gerado pelos diversos grupos de pesquisa em todo mundo ainda não permitiu que os resultados obtidos *in vitro* estejam próximos dos verificados *in vivo* (BAVISTER, 1995; KHURANA e NIEMANN, 2000; LONERGAN *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c, 2003d). Até hoje, pesquisas têm sido realizadas no intuito de se descobrir qual o melhor ambiente, tanto físico quanto químico, para o desenvolvimento *in vitro* de embriões.

Dentre os conhecimentos gerados ao longo dos anos, é consenso de que há um incremento significativo nas taxas de desenvolvimento embrionário quando o cultivo *in vitro* (CIV) é realizado em grupos (LANE e GARDNER, 1992; HOLM *et al.*, 1998), quando comparados ao cultivo individual. Segundo aqueles autores, o CIV em grupo é benéfico ao desenvolvimento embrionário, pois ocorre uma interação positiva entre os embriões, onde os mesmos estimulam-se mutuamente por via parácrina através da produção, por exemplo, de fatores de crescimento, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e -II), o fator de crescimento de transformação α e β (TGF- α e - β), entre outros. Por outro lado, quando cultivados em grupos, pode haver o efeito negativo da presença de oócitos não-fecundados e embriões degenerados (GANDOLFI *et al.*, 1994).

Em muitos casos, faz-se necessário que os embriões sejam cultivados em pequenos grupos ou mesmo de forma individual como, por exemplo, no sistema de cultivo comercial de embriões bovinos, onde biópsias podem ser realizadas com o intuito de se diagnosticar o gênero embrionário (sexagem) antes da transferência para receptoras; no cultivo de embriões sem zona pelúcida (ZP), como os produzidos pela técnica de *handmade cloning* (HMC); e nos sistemas de cultivo de embriões humanos, onde o desenvolvimento de cada embrião precisa ser avaliado de forma individual. Outra razão para essa necessidade, por exemplo, é o baixo número de oócitos viáveis provenientes de procedimentos de punção folicular (OPU) em bovinos de raças européias e, também, a necessidade de identificação de embriões humanos após a

genotipagem. Além disso, o cultivo individualizado permite avaliar a qualidade específica de um embrião, durante todo o período de CIV, o que pode resultar em um aumento nas taxas de prenhez (VAJTA *et al.*, 2000; KRISHER e WHEELER, 2010).

A composição do meio e as condições de CIV, bem como o microambiente, afetam os embriões clonados, pois estes são cultivados em condições similares aos protocolos padrão de CIV para embriões com ZP. Contudo, devido ao fato de os embriões reconstruídos por HMC serem desprovidos de ZP, o cultivo em grupos na forma tradicional, isto é, em microgotas de 30 a 100 μ L, fica inviável, podendo resultar na agregação embrionária durante o desenvolvimento, na separação ou extrusão de blastômeros durante as primeiras clivagens, ou mesmo na ineficiente compactação embrionária (VAJTA *et al.* 2005). Como alternativa, diferentes grupos de pesquisas vêm trabalhando no desenvolvimento de novos sistemas de CIV, objetivando o cultivo individual de embriões, como, por exemplo, o cultivo em microgotas, descrito por Peura *et al.* (1998), o sistema *Well-of-the-Well* (WOW), proposto por Vajta *et al.* (2000) e o sistema em poços em ágar desenvolvido por Peura (2003).

Neste sentido, o sistema WOW (VAJTA *et al.*, 2000) foi idealizado com o objetivo de individualizar os embriões durante o cultivo em seu microambiente, permitindo que utilizem, concomitante, o mesmo macroambiente, ou seja, que os fatores produzidos por um embrião possam ser compartilhados entre os demais. Este sistema vem sendo utilizado com sucesso na produção de embriões bovinos, de embriões suínos e também de embriões humanos (VATJA *et al.*, 2008).

Modificações aparentemente significativas no sistema WOW convencional para o cultivo de embriões sem zona pelúcida produzidos pela técnica de HMC, proposto por Vajta (2000), foram realizadas por Feltrin *et al.* (2006a), por meio da alteração da forma e tamanho dos micropoços de cultivo. A diminuição no diâmetro (de 280 μ m para 130 μ m) e a modificação na forma do micropoço (convexo para cônico) incrementaram significativamente as taxas de blastocisto (BL) no Dia 7 de desenvolvimento, provavelmente, por mimetizar os efeitos físicos da zona pelúcida, diminuindo a desagregação de blastômeros durante as primeiras clivagens, favorecendo a posterior compactação embrionária, provavelmente, por permitir uma maior concentração de fatores parácrinos e autócrinos, favorecida por um microambiente mais restrito.

Embora se saiba que o ambiente físico é de extrema importância para o desenvolvimento embrionário, maior ênfase tem sido dada às condições bioquímicas,

especialmente ao metabolismo embrionário e ao desenvolvimento de meios de maturação, fecundação e cultivo embrionários *in vitro*, buscando níveis adequados de substratos e componentes embriotróficos para cada estágio do desenvolvimento embrionário, específico para cada espécie. É consenso que o meio ideal deva mudar sua composição conforme o estágio embrionário, pois *in vivo* os embriões estariam em progressão através do trato reprodutivo da fêmea, mudando constantemente de ambiente (LEESE e ALDRIDGE, 1979; LEESE *et al.* 1979a, 1979b; LEESE, 1983, 1988, 1998, HARDY *et al.* 1989; GARDNER e LEESE 1990, GARDNER *et al.*, 1996; GARDNER, 1998a, 1998b, 1999). Contudo, este fluxo contínuo de "meio" ao redor do embrião, em micro ou picovolumes, é praticamente impossível de ser alcançado quando se utiliza o sistema de CIV em microgotas. Segundo Krisher e Wheeler (2010), esta poderia ser parte da razão pela qual, o desenvolvimento *in vitro* ainda é ineficiente, apesar das melhorias significativas no ambiente químico dos meios de PIV, resultando freqüentemente em embriões com potencial sub-ótimo de desenvolvimento. Neste sentido, aqueles autores afirmam que a aplicação dos sistemas de microfluidos para PIV de embriões é mais uma ferramenta que nos permite avaliar o comportamento embrionário em sistemas de produção estáticos e dinâmicos, podendo mimetizar o desenvolvimento *in vivo*, o que possibilitaria, provalmente, um incremento nas taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*.

Dentre os trabalhos idealizados com o objetivo de modificar o ambiente físico, tanto o sistema WOW convencional quanto o WOW modificado apresentam certa variabilidade durante a confecção dos micropoços, tanto em relação ao tamanho quanto na própria superfície, inerente ao sistema de produção manual nos diferentes laboratórios. Isto ocorre não só pelos diferentes instrumentos (ponteiras ou agulhas) utilizados nas confecções dos micropoços, mas também pela habilidade de quem os confecciona. Como alternativa para solucionar este problema, foi desenvolvida, em conjunto com a equipe do Prof. Wheeler do Departamento de Zootecnia da Universidade de Illinois, EUA, uma placa de cultivo embrionário confeccionada em polidimetilsiloxano (WOW - PDMS) com 49 micropoços de aproximadamente 170 µm de diâmetro, todos interligados através de microcanais com 80 µm de largura. O objetivo é padronizar e incrementar o sistema de cultivo WOW nos diferentes laboratórios. Este polímero orgânico (PDMS) foi testado por diferentes grupos e

apresentou baixa toxicidade para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e para o cultivo de células-tronco mesenquimais (WHEELER *et al.*, 2004, 2007).

Embora seja largamente aceito que o principal benefício do sistema WOW seria o incremento na concentração de fatores autócrinos e parácrinos (TAKA *et al.*, 2005), poucos estudos vêm buscando alternativas para melhorar o ambiente físico, com conseqüente incremento nas taxas de blastocisto e prenhez. Neste sentido, o sistema WOW-PDMS poderia permitir uma maior difusão dos fatores embriotróficos, através da união entre os micropoços, estimulando o desenvolvimento embrionário e, também, facilitando a dispersão dos fatores embriotóxicos presentes no cultivo. O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos clonados pela técnica de HMC e submetidos a três diferentes sistemas de CIV em micropoços, sendo um industrial, confeccionado em polidimetilsiloxano (PDMS), que visou a padronização da configuração do sistema de CIV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Clonagem Animal por Transferência Nuclear (TN)

A palavra clone, que significa broto, é derivada do termo grego *klon*. Pode-se definir clonagem como uma maneira de reprodução assexuada, a qual permite a geração de indivíduos geneticamente idênticos. Isto poder ser alcançado, por exemplo, com metodologias de bipartição de embriões (FOOTE, 2002) e com a desagregação de blastômeros (WILLADSEN, 1986).

Para muitos autores o pai da clonagem animal experimental é o pesquisador Hans Spemann. Seus experimentos em clonagem de anfíbios, por bipartição embrionária em 1902, e por transferência nuclear (TN) em 1924, iniciaram a compreensão dos eventos de diferenciação celular. Já em 1938, Spemann descreveu os conceitos básicos da clonagem animal por TN, conceitos estes que permanecem como fundamento para as tecnologias de TN utilizadas atualmente (TAGARELI *et al.*, 2004).

De forma independente, Briggs & King (1952) realizaram o primeiro experimento de TN com relativo sucesso utilizando células embrionárias de anfíbios. Naquele experimento, os autores obtiveram clones de anfíbios que atingiram o estágio larval. Porém, em 1962, John Gurdon obteve o desenvolvimento de rãs até a forma adulta por meio da transferência nuclear (GURDON e BYRNE, 2004). Transcorreram-se então quase duas décadas, quando Illmensee e Hoppe, em 1981, utilizando células da massa celular interna (ICM), obtiveram o nascimento de camundongos através da TN. Entretanto, como não houve repetibilidade do experimento por outros grupos de pesquisadores, o trabalho gerou diversos questionamentos quanto a sua veracidade (NEWMARK, 1983).

Devido ao fato de os experimentos de Illmensee não terem apresentado repetibilidade por outros laboratórios, o grande marco da TN passou a ser o experimento de Willadsen (1986). Neste, o pesquisador obteve o nascimento de clones ovinos, utilizando blastômeros de embriões no estágio de 8-células. Estes clones ovinos são considerados os primeiros mamíferos produzidos pela técnica da clonagem por TN.

Mais uma década é transposta quando em 1996, Campbell et al. (1996)

obtiveram o nascimento de clones ovinos a partir de células embrionárias cultivadas e diferenciadas *in vitro*. Este trabalho pavimentou o caminho para um dos marcos mais significativos da biologia moderna, o nascimento da ovelha Dolly em 1996 (WILMUT *et al.*, 1997), primeiro clone produzido a partir de núcleos de células somáticas adultas. Neste momento quebrou-se um dos maiores paradigmas da biologia, o qual predizia não ser possível a reprogramação de células somáticas adultas para a geração de um novo indivíduo. Este trabalho também abriu as portas para o entendimento de diversos aspectos básicos da diferenciação celular, possibilitando um melhor entendimento da totipotência e pluripotência celular.

Em 1997, Schnieke *et al.* obtiveram o nascimento do primeiro clone transgênico, a ovelha Polly, produzida a partir de fibroblastos fetais transfectados com o fator IX de coagulação humano, demonstrando o potencial de aplicabilidade da tecnologia em estabelecimento. Os diversos trabalhos subsequentes produzidos através da TN serviram como base fundamental para o nascimento de animais de diferentes espécies, estando entre eles os bovinos (KATO *et al.*, 1998), os camundongos (WAKAYAMA *et al.*, 1998), os caprinos (BAGUISI *et al.*, 1999), os suínos (POLEJAEVA *et al.*, 2000), o Gaur (LANZA *et al.*, 2000), o carneiro montês da Europa (LOI *et al.*, 2001), o bisão indiano (VOGEL, 2001), o gato doméstico (SHIN *et al.*, 2002), o coelho (CHESNE *et al.*, 2002), o cavalo (GALLI *et al.*, 2003), o rato (ZHOU *et al.*, 2003), a mula (WOODS *et al.*, 2003), o gato selvagem (GÓMEZ *et al.*, 2004), o boi de Java (JANSSEN *et al.*, 2004), o cão (LEE *et al.*, 2005), a carpa comum (SUN *et al.*, 2005), o furão (LI *et al.*, 2006b), o lobo cinzento (KIM *et al.*, 2007), o búfalo (SHAH *et al.*, 2009) e o dromedário (WANI *et al.*, 2010).

Contudo, a eficiência da tecnologia ainda permanece reduzida, ocorrendo problemas associados a elevadas taxas de perdas embrionárias e fetais, anormalidades de desenvolvimento e alta morbidade e mortalidade perinatais, todos inerentes ao processo de clonagem (BERTOLINI *et al.*, 2007). As condições de cultivo *in vitro* de embriões e falhas de reprogramação nuclear, que ocorrem durante os procedimentos de TN, estão relacionadas diretamente ao aparecimento de anormalidades (WRENZYCKI *et al.*, 1998, 1999; BOURC'HIS *et al.*, 2001; BERTOLINI *et al.*, 2002b).

A produção de embriões clonados pela transferência nuclear de células somáticas (TNCS) parece estar intimamente associada à perda embrionária precoce e tardia, abortos, distocias, hidropsia dos envoltórios fetais, nascimento de terneiros com a

Síndrome do Terneiro Absolutamente Grande (LOS), dilatação do cordão umbilical, aumento de peso e tamanho corporal, hipotermia, baixa imunidade, hipoglicemia, entre outros sintomas (WILSON *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1996; RENARD *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2000; WELLS *et al.*, 2004; PEDERSEN *et al.*, 2005; CONSTANT *et al.*, 2006; BATCHELDER *et al.*, 2005, 2007ab; BERTOLINI *et al.*, 2007). Grande parte dos autores acredita que o aparecimento destes problemas está associado diretamente com a placenta (BERTOLINI *et al.*, 2002a; WELLS *et al.*, 2004; FARIN *et al.*, 2006). Segundo BERTOLINI *et al.* (2007) nem os mecanismos fisiológicos nem os moleculares deste fenômeno, definidos no início do desenvolvimento embrionário, são atualmente conhecidos. A soma de todos estes fatores permite que apenas um número pequeno de embriões clonados transferidos (entre 1 e 5%) chegue a termo (OBACK e WELLS, 2003) e que em torno de 40% a 80% sobreviva no primeiro ano de vida (HILL e CHAVATTE-PALMER, 2002). Um dos fatores considerados de relevância para o aparecimento de anormalidades parece estar relacionado ao tipo de célula doadora de núcleo utilizado em experimento de clonagem animal por TN.

2.2 Células Doadoras de Núcleo

A escolha do núcleo doador utilizado nos procedimento de clonagem tem vital importância para o sucesso da técnica, pois a efetiva reprogramação nuclear, após a TN, depende do tipo célula, do ciclo celular, do grau de diferenciação da célula doadora, entre outros fatores (WELLS *et al.*, 2003; OBACK e WELLS, 2002). Células provenientes de diferentes tecidos têm sido utilizadas na clonagem como doadoras de núcleo com relativo sucesso. Alguns exemplos de tipos celulares, que já foram utilizados nos procedimentos de clonagem, incluem: células epiteliais de glândula mamária, células do *cumulus oophorus*, linfócitos B e T, células da granulosa, hepatócitos, células de Sertoli, neurônios e fibroblastos (BREM e KÜHHOLZER, 2002; MIYOSHI *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2007).

Acredita-se que alguns tipos celulares são reprogramados de forma mais eficiente do que outros, após a reconstrução embrionária pela clonagem animal (CAMPBELL *et al.*, 2007). A base para esta afirmação seria que quanto mais diferenciada for a célula, mais difícil esta será de ser reprogramada e dar origem a todos os tecidos de um novo indivíduo saudável (WILLADSEN, 1986; OBACK e WELLS, 2002). Sabe-se que

células menos diferenciadas, tais como células embrionárias, apresentam maior capacidade de serem reprogramadas, gerando, portanto, um maior número de indivíduos viáveis, quando comparadas às células adultas e fetais (KIM *et al.*, 2007).

Acredita-se que as células-tronco mesenquimais (CTM), por serem células menos diferenciadas, possam apresentar características semelhantes às das células embrionárias, sendo mais fáceis de serem reprogramadas. Dentro desta perspectiva, uma alternativa seria então, a utilização de CTM como doadoras de núcleo, para a obtenção de clones mais saudáveis. Em especial, devido à facilidade de obtenção, as CTM isoladas a partir do tecido adiposo têm recebido grande atenção da comunidade científica (JAISWAL *et al.*, 1997).

Sabe-se que as CTM, praticamente não expressam ou expressam poucos marcadores específicos de linhagem, o que torna difícil a sua caracterização e reconhecimento. Portanto, a caracterização destas ocorre em função de suas propriedades funcionais. Assim, células-tronco são não-diferenciadas; apresentam alta capacidade de proliferação; são capazes de se auto-renovar e de regenerar um tecido após lesão; e de modular suas próprias atribuições (LOEFFLER e POTTEN, 1997); podendo ser isoladas a partir da medula óssea e do tecido adiposo.

Um experimento realizado no final da década de 90 demonstrou que as CTM estão presentes no tecido adiposo em grande número, sendo capazes de se diferenciar *in vitro* em células osteogênicas, adipogênicas e cartilaginosas, entre outras (JAISWAL *et al.*, 1997). Além disso, a facilidade de obtenção do tecido adiposo, tanto em humanos quanto em animais, tem impulsionado o crescimento de inúmeras pesquisas com o intuito de avaliar a capacidade destas células em dar origem a novos tecidos, tornando o seu uso possível em terapias regenerativas e nos procedimentos de clonagem (ZUK *et al.*, 2001).

Apesar de alguns trabalhos não demonstrarem diferenças *in vitro* em bovinos (FELTRIN *et al.*, 2006b), alguns autores obtiveram o nascimento de clones a partir de CTM, demonstrando que estas células são capazes de produzir clones viáveis. Forell *et al.* (2008) obtiveram o nascimento de clones bovinos produzidos a partir de CTM isoladas de tecido adiposo, demonstrando o bom potencial de uso destas células.

Faast *et al.* (2006) e Kumar *et al.* (2007), durante procedimentos de clonagem, compararam a utilização de células somáticas e CTM suínas, isoladas de medula óssea, verificando que houve um incremento de desenvolvimento embrionário *in vitro*

significativo quando as células utilizadas eram CTM. Entretanto, Colleoni *et al.* (2005), não encontraram diferença significativa pelo uso de CTM. Permanece, então, pouco conhecido, o potencial deste tipo celular quando aplicado à clonagem por TN.

2.3 *Handmade Cloning* e Cultivos Embrionários *in vitro*

Não obstante às novas possibilidades para a utilização da clonagem animal, a técnica de TNCS permaneceu restrita a grupos estabelecidos, visto a complexidade e elevado grau de tecnificação e estruturação que a técnica exigia. No final da década de 90, no entanto, alguns autores (PEURA *et al.*, 1998 e VATJA *et al.*, 2001, 2002) desenvolveram uma técnica denominada *handmade cloning* (HMC), ou clonagem manual, com o intuito inicial de desenvolvimento científico e posterior universalização das técnicas de clonagem. Esta técnica por não exigir o uso de micromanipuladores, possui menor custo de implementação e exige um menor tempo de treinamento quando comparada à clonagem convencional com a utilização da micromanipulação. Como os embriões produzidos pelo HMC são desprovidos de ZP, VAJTA *et al.* (2000) criaram uma técnica de cultivo *in vitro* (CIV), chamada *Well-of-the-Well* (WOW), que permitiu o desenvolvimento em grupo, onde todos os embriões compartilham do mesmo macroambiente sem, contudo, agregarem-se espontaneamente.

Utilizando a técnica de HMC já foram obtidos nascimentos de clones bovinos (TERCILIOGLU *et al.*, 2005), suínos (DU *et al.*, 2007) e eqüinos (LAGUTINA *et al.*, 2005).

2.4 Sistemas de Microfluidos

Uma nova alternativa para a produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido proposta nos últimos anos. Trata-se de sistemas/dispositivos de microfluidos, os quais tentam mimetizar o ambiente *in vivo* como alternativa para incrementar a qualidade embrionária e, conseqüentemente, as taxas de prenhez. Além disso, estes sistemas podem ser automatizados, diminuindo a grande variabilidade existente entre os diferentes laboratórios (KRISHER e WHEELER, 2010). A maioria dos dispositivos microfluídicos atuais é fabricada por fotolitografia, em polidimetilsiloxano (PDMS), um tipo de silicone atóxico, transparente e que possui propriedades mecânicas favoráveis à micromoldagem (BEEBE *et al.*, 2002; SUH *et al.*, 2003; WALTERS *et al.*, 2004). Estes dispositivos microfluídicos são baratos, permeáveis a diferentes gases e fáceis de manipular, particularmente quando comparados com os protótipos anteriores que utilizavam o vidro siliconado (GLASGOW *et al.* 2001; SUH *et al.* 2003).

Sabe-se que o ambiente proporcionado durante a PIV de embriões, em microgotas sob óleo mineral, sistema padrão utilizado por grande parte dos laboratórios que trabalham com reprodução assistida, é estático, isto é, o meio de cultivo não se altera em torno do embrião ao longo do tempo, exceto quando há a troca dos meios entre os intervalos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Já os sistemas de microfluidos podem simular um ambiente dinâmico ou estático, pois a taxa de fluxo de meio ao redor do embrião pode ser controlada com precisão (WHEELER *et al.*, 2007). Neste sentido, um sistema estático pode permitir que fatores benéficos, tanto aqueles secretados pelo embrião como aqueles presentes no próprio meio, concentrem-se em torno do mesmo. No entanto, neste sistema os subprodutos gerados pelo próprio cultivo acumulam-se também ao redor do embrião, prejudicando o desenvolvimento embrionário.

Diversos estudos têm demonstrado a adequação dos dispositivos microfluídicos para a cultura de embriões de camundongos (GLASGOW, 2001; RATY *et al.*, 2004; HEO *et al.*, 2007; MELIN *et al.*, 2009). Embriões cultivados em microcanais apresentaram melhores taxas de clivagem e de blastocistos quando comparados com o cultivo padrão em microgotas (RATY *et al.*, 2004). Dentro desta perspectiva, o sistema

dinâmico deve atingir a taxa de fluxo correta de tal forma que os fatores benéficos não sejam dispersos, mas os subprodutos sejam removidos. Para avaliar esta hipótese, foi desenvolvido por Bormann *et al.* (2008a) um sistema de microcanais que permite a coleta do meio após o fluxo através dos embriões. Isso pode futuramente levar à identificação dos fatores secretados pelos embriões, especificamente, daqueles que identificam atributos associados a uma boa ou má qualidade embrionária.

Cada etapa dos procedimentos de PIV deve ser padronizada para a utilização de dispositivos microfluídicos. Na busca desta padronização, diversos estudos têm sido propostos. Entre eles está a remoção da zona pelúcida (útil para a criação de quimeras) e das células do *cumulus*, as quais têm sido realizadas em um sistema fechado com pressão e fluxo controlados (ZERINGUE *et al.*, 2000, 2001). A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos nestes dispositivos microfluídicos resultou na formação de blastocistos com maior número de células (BORMANN *et al.*, 2008b) e a FIV de oócitos suínos também foi realizada com sucesso (CLARK *et al.*, 2005). Neste trabalho de FIV em suínos, os autores verificaram que as taxas de fecundação e desenvolvimento pronuclear não diferiram daquelas obtidas com a FIV em microgotas. No entanto, a taxa de polispermia, um dos principais problemas da PIV em suínos, foi significativamente reduzida após a fecundação nos microcanais, possivelmente devido à semelhança do ambiente microfluídico às condições encontradas no oviduto, em relação aos parâmetros físicos (CLARK *et al.*, 2005).

Até o presente momento, os diferentes trabalhos produzidos revelaram o potencial de aplicação da microfluídica na cultura de gametas e embriões, sendo que os resultados têm sido pelo menos equivalentes e, às vezes, melhores que os obtidos em microgotas (WHEELER *et al.*, 2004; SMITH e TAKAYAMA, 2007). Torna-se óbvio que mais estudos são necessários nesta área para a identificação das condições mais próximas possíveis da fisiológica para o cultivo *in vitro* de embriões mamíferos.

Os primeiros trabalhos utilizando dispositivos microfluídicos, propostos por Wheller *et al.* (2004), apesar do relativo sucesso, ainda se encontraram em fase de aprimoramento e novas pesquisas devem ser conduzidas na tentativa de serem definidos os parâmetros para um melhor ambiente de cultivo, tanto físico como químico, objetivando resultados mais próximos dos verificados *in vivo*.

Dentre as inúmeras possibilidades surgidas com o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos e que podem ser aplicadas às tecnologias de reprodução

assistida, o cultivo individual de ovócitos e embriões surge como uma nova alternativa. Neste sentido, foi desenvolvida uma placa de cultivo embrionário confeccionada em polidimetilsiloxano, com e sem microcanais, interligando os micropoços. Estes dispositivos podem ser utilizados em qualquer placa de cultivo e são de fácil fabricação, o que os torna uma boa alternativa para a substituição dos métodos convencionais. Além disso, o dispositivo com microcanais, com os devidos ajustes, pode mimetizar o ambiente *in vivo*, por meio do fluxo de meio, podendo constituir-se em um sistema dinâmico de cultivo. O objetivo destes dispositivos é padronizar e incrementar os resultados obtidos com o sistema de cultivo WOW. Para isso, o dispositivo está sendo testado em diversos laboratórios e, até o presente momento, nenhum dado foi publicado a respeito do desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* dos embriões produzidos por este novo dispositivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios e Reagentes

Os reagentes utilizados, quando não indicado, foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), sendo que o número do catálogo está destacado entre parênteses. A água utilizada na confecção dos meios de cultivo foi obtida por ultrafiltração através do equipamento Milli-Q Synthesis (Millipore Berford, MA, EUA). Os meios TCM-HEPES, TCM-199, Fert-TALP, Sperm-TALP e SOF foram produzidos na empresa Bio Biotecnologia Animal (Brasília, DF).

3.2 Isolamento e Diferenciação de CTM Bovinas de Origem Adiposa

As células-tronco mesenquimais (CTM) utilizadas no experimento foram isoladas de tecido adiposo de uma fêmea bovina da raça Nelore com 7 anos de idade. Após a coleta do tecido, de forma asséptica, este foi macerado, com auxílio de uma lâmina de bisturi, em uma placa de Petri de 90 mm (Corning Incorporated, NY, EUA), sendo logo após embebido em PBS (Nutricell). Em seguida, o tecido foi colocado em tubos de 50 mL (Corning Incorporated, NY, EUA) mantendo-se a seguinte proporção: 25 mL de tecido em PBS e 25 mL de uma solução de colagenase (C2674) a 0,075%. Os tubos foram incubados a 38,3°C por 60 min, sendo agitados a cada 10 min.

Após a digestão enzimática do tecido, este foi centrifugado a 1000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 2 mL de tampão para lise de eritrócitos (RBC, R7757), com exposição por 2 min. Após, o RBC foi diluído através da adição de 20 mL de PBS e, em seguida, a amostra foi novamente centrifugada (1000 rpm) por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de meio de cultivo DMEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de SFB. Logo após, as células foram semeadas em garrafas de 25 cm² (Corning Incorporated, NY, EUA), contendo 5 mL de meio de cultivo DMEM + 10% de soro fetal bovino (SFB), e cultivadas em incubadora a 38,3°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade relativa de 100%.

3.2.1 Congelação das Células

A crioconservação para posterior utilização foi realizada quando as células apresentavam aproximadamente 50% de confluência. Todas as células utilizadas durante o experimento foram crioconservadas com o meio de congelação que apresentava a seguinte composição: 60% de meio DMEM; 20% de DMSO (D2650) e 20% de SFB (Nutricell).

Para a realização da congelação as células foram lavadas em PBS (4 mL) durante 2 min e expostas à solução de tripsina-EDTA (Nutricell) durante aproximadamente 3 min, mantendo-se um controle visual da digestão. A inativação da tripsina era proporcionada pela adição de 4 mL de meio de cultivo DMEM + 10% SFB. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo de 15 mL e homogeneizada. Finalmente retirava-se 20 µL da suspensão para a contagem do número total de células presentes na amostra. Após, o tubo era centrifugado durante 5 min a 1000 rpm, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspense em meio de congelação.

A suspensão contendo as células e o crioprotetor foi envasada em palhetas de 0,5 mL, que foram mantidas a 4°C por 1 h. Após este período, as palhetas foram mantidas por 20 min em vapor de nitrogênio, sendo, logo após, imersas em nitrogênio líquido.

3.2.2 Descongelação das Células

A descongelação foi realizada dois dias antes dos procedimentos de clonagem e os cultivos que apresentavam mais de 70% de confluência, no dia da TN, foram descartadas. A descongelação foi realizada mediante a manutenção das palhetas em água ultrapura a 39°C até que se visualizasse o total descongelamento da amostra. Imediatamente, ao conteúdo das palhetas eram adicionados 10 mL de meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB. A solução foi centrifugada à velocidade de 1000 rpm, sendo o sedimento ressuspense em 6 mL de meio de cultivo pronto para uso. Logo após, as células foram semeadas em garrafas de cultivo com 25cm² e incubadas a 38,3°C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ em ar e umidade relativa de 100%.

3.3 Protocolo de diferenciação osteogênico

Com o intuito de avaliar a capacidade de diferenciação das CTM isoladas de tecido adiposo, estas foram cultivadas por 14 dias em meio de diferenciação para tecido osteogênico. A indução da diferenciação das CTM em tecido osteogênico iniciou quando o cultivo estava com aproximadamente 80% de confluência. A viabilidade da diferenciação se dá através do cultivo celular em meio DMEM suplementado com 0,1 μ M de dexametasona (D4902), 10 mM de β -glicerolfosfato (G9891) e 50 μ M de ácido ascórbico (A4403). O início da diferenciação era visualizado através da formação de nódulos de cálcio presentes em todo o cultivo (Figura 1).

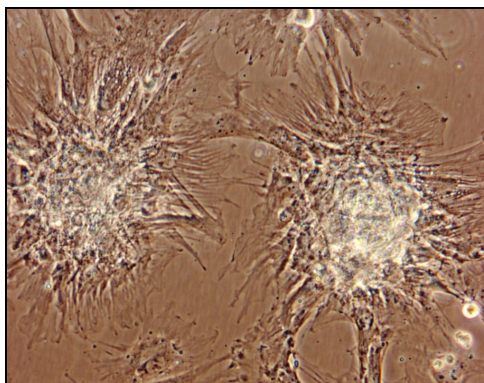


Figura 1 – Formação de nódulos de cálcio após cultivo de células TM de tecido adiposo em meio de diferenciação para tecido osteogênico (200X).

3.3.1 Coloração de Von Kossa

O cultivo celular era inicialmente lavado em PBS. Após, os cultivos eram fixados com 4% de paraformaldeído por 1 h. Terminada a fixação, as células eram enxaguadas com água destilada e incubadas por 30 min em solução de nitrato de prata a 5%. Passados os 30 min, o cultivo era novamente lavado com água destilada sendo, logo após, exposto à luz UV por 1 h. Terminado todo o processo, o cultivo era avaliado com auxílio de um microscópio invertido com contraste de fase, em magnitude de 100X, 200X e 400X. As áreas nodulares com depósito de cálcio eram visualizadas através da coloração parda/amarronzada (Figura 2).

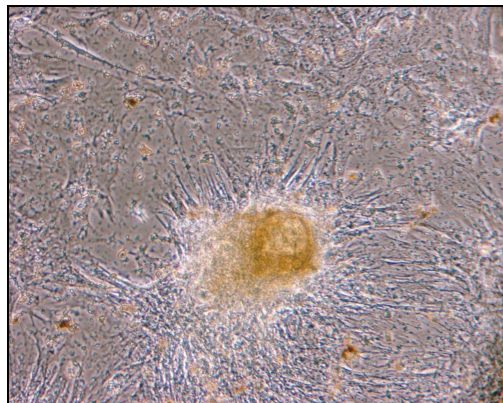


Figura 2 – Nódulo de cálcio corado pelo nitrato de prata (200X).

3.3.2 Coloração de Alizarina

A solução de coloração foi preparada diluindo-se 200 mg de Alizarina em 50 mL de água. Após a diluição, adicionava-se uma solução de amônia (1 N) até que o pH estabilizasse em 4,2.

Neste processo de coloração, retirava-se o meio de cultivo do frasco e imediatamente as células eram enxaguadas com PBS. O cultivo foi fixado com 10% de formalina por 30 min. Passado o tempo de fixação, o cultivo era coberto pela solução de coloração por 10 min. Enxaguavam-se as células novamente com água, seguido de PBS. Terminado todo o processo, o cultivo era avaliado em microscópio invertido com contraste de fase, em magnitude de 100X, 200X e 400X. As áreas nodulares com depósito de cálcio eram visualizadas através da coloração vermelha (Figura 3).

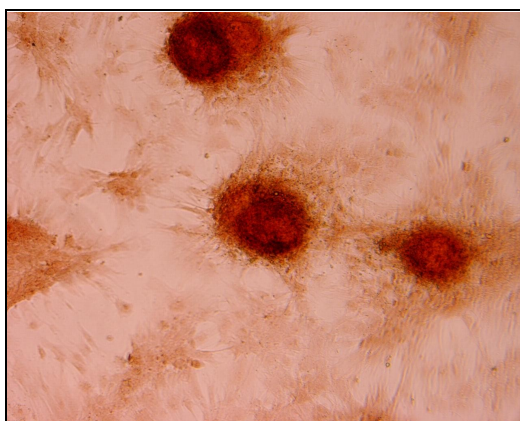


Figura 3 – Nódulo de cálcio corado com alizarina (200X).

3.4 Clonagem por *handmade cloning* (HMC)

3.4.1 Obtenção e Seleção de Oócitos Bovinos

Os ovários foram obtidos de fêmeas após o abate e transportados até o laboratório em recipiente isotérmico, a 34°C, em DPBS (Nutricel). O transporte levava cerca de 1 h, sendo que após a chegada, os ovários eram lavados em PBS e mantidos a 34°C. Os complexos *cumuli-oócito* (CCOs) foram obtidos através da punção de folículos entre 3-8 mm, realizada com seringa de 10 mL e agulha 18 G.

Após a punção dos folículos, o fluido folicular foi depositado em tubos de 15 mL durante 15 min para que houvesse a sedimentação das estruturas recuperadas. Após a retirada do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 10 mL de meio TCM-HEPES suplementado com 0,4% de BSA.

O meio contendo os CCOs foi transferido para placas de Petri de 100 mm (C10, Pleion), onde realizava-se a procura dos oócitos sob estereomicroscópio. Os CCOs que apresentaram *cumulus oophorus* compacto e citoplasma homogêneo foram selecionados e colocados em placas de cultivo de 35 mm (627.160 – Greiner, Freickenhausen, Alemanha) contendo meio TCM199-HEPES.

Finalizado o processo de procura, as estruturas foram maturadas *in vitro*, em placas de 4 poços (Nunc®, Roskilde, Dinamarca) contendo 400 µL de meio de maturação (TCM199) suplementado com 10% de SFB, em incubadora de cultivo a 38,3°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade relativa de 100%, durante 17 h.

3.4.2 Preparo dos Oócitos

Após 17 h de maturação, os CCOs foram pipetados, com o auxílio de uma micropipeta de 200 µL, até a remoção total das células do *cumulus oophorus*, sendo em seguida colocados em meio TCM-HEPES suplementado com 0,4% de BSA. Após, os

oócitos foram selecionados quanto ao aspecto homogêneo do citoplasma e à presença do primeiro corpúsculo polar. Em seguida, as estruturas foram incubadas por 60 min em solução contendo 0,4 µg/mL de demecolcina (D1925), a 38,3°C.

3.4.3 Digestão da Zona Pelúcida

Para a remoção da zona pelúcida (ZP), os oócitos foram expostos à solução contendo 0,5% de Protease (E8811), sendo que o tempo necessário para a remoção foi controlado visualmente, com uma variação entre 30 s e 90 s. Após a digestão, os oócitos foram colocados em gotas de 80 µL, sob óleo mineral, contendo TCM-HEPES suplementado com 20% de SFB.

3.4.4 Bissecação dos Oócitos

Para que fosse realizada a bissecção manual dos oócitos, os mesmos foram incubados por 15 min em uma solução contendo 5 µg/mL de citocalasina-B (CB, C6762). Após, em uma placa de Petri de 60 mm, foram confeccionadas microgotas de 5 µL contendo a solução de CB, onde foram colocados de 2 a 3 oócitos/microgota. A secção foi realizada com o auxílio de uma lâmina (Ultra Sharp Splitting Blade – AB Technology) mediante uso de um estereomicroscópio (25X). Os oócitos foram bisseccionados, e os hemi-citoplastos que apresentavam o 1º corpúsculo aderido à membrana plasmática ou o cone de protrusão, foram descartados.

Após a bissecção, os hemi-citoplastos permaneciam por mais 5 min em uma solução contendo CB, de forma que houvesse a reorganização das membranas citoplasmáticas das metades seccionadas.

3.4.5 Preparo das Células Doadoras de Núcleo

As células doadoras de núcleo utilizadas na etapa de reconstrução foram CTM isoladas de tecido adiposo. Essas células foram mantidas em cultivo em placas até a formação de tapete celular confluyente em 50% de sua superfície. No momento da utilização, as células foram desprendidas do fundo da placa, através da digestão com

tripsina, lavadas e ressuspensas em meio TCM – HEPES suplementado com 0,4% de BSA.

3.4.6 Reconstrução

Para que fosse realizada a reconstrução, os hemi-citoplastos foram expostos a uma solução contendo 500 µg/mL de fitohemoaglutinina (PHA, L-8754) em meio TCM-HEPES. Logo após, as estruturas foram reconstruídas de acordo com Ribeiro *et al.* (2009), mantendo-se a seguinte proporção: dois hemi-citoplastos mais a célula doadora de núcleo (Figura 4A).

3.4.7 Eletrofusão

Os complexos hemi-citoplastos-célula doadora de núcleo (HC-CD) foram transferidos, mediante um capilar de vidro, para uma câmara de eletrofusão (BTX 453), contendo 550 µL de meio para eletrofusão (Manitol, M1902), onde recebiam duas descargas elétricas de 1.0 kV/cm durante 20 µs (corrente contínua), após uma breve exposição a uma corrente alternada de 15 V. A avaliação da taxa de fusão foi realizada 30 min após a eletrofusão, através da observação dos complexos HC-CD sob estereomicroscopia (Figura 4B).

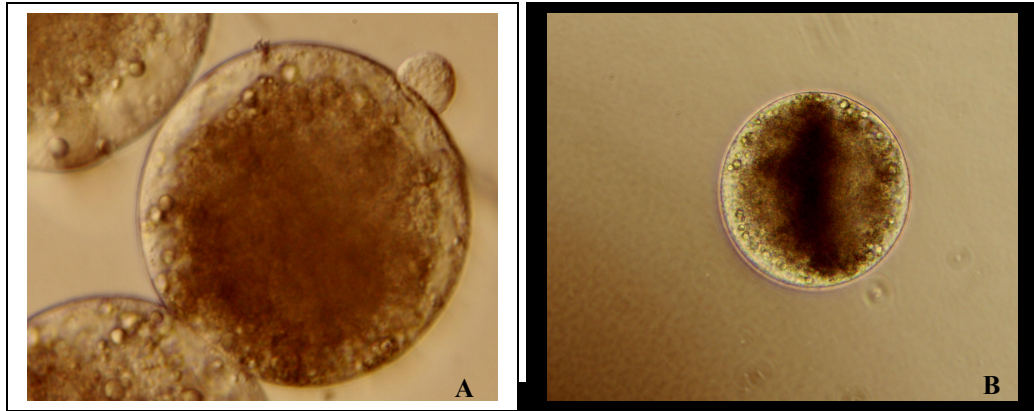


Figura 4 – (A) Reconstrução dos hemi-citoplastos com a CTM antes da eletrofusão das membranas (400X). (B) Estruturas em reorganização, após a fusão (200X).

3.4.8 Ativação

Para que ocorresse a ativação, os complexos HC-CD fusionados foram expostos por 5 min a uma solução contendo 5 μM de ionomicina (I0634). Em seguida, as estruturas reconstituídas foram incubadas a 38,3°C durante 210 min em meio TCM-HEPES suplementado com 2 mM de 6-DMAP (D2629).

Os embriões reconstruídos foram cultivados de forma individual em meio SOFaa suplementado com 10% de SFB, a 38,3°C, com 100% de umidade relativa, 5% de CO_2 , 5% de O_2 em 90% N_2 .

3.4.9 FIV

As rotinas de FIV foram conduzidas como controle de desenvolvimento embrionário do experimento. A MIV foi realizada em placas de 4 poços contendo 400 μL de meio TCM199 suplementado com 10% de SFB, durante 22 h. Após, os espermatozóides utilizados na fecundação foram obtidos a partir de palhetas de 0,25 mL com sêmen congelado da mesma partida de um touro da raça Nelore. A seleção dos espermatozóides foi realizada através da separação em gradiente descontínuo de Percoll (45%/90%), por centrifugação a 500 G durante 10 min. Estes foram ressuspensos em 2 mL de meio Sperm-TALP e centrifugados por 2 min. O *pellet* final foi ressuspensão em 50 μL de Fert-TALP e as gotas contendo os oócitos foram inseminadas com um volume médio de 3 μL , que continha $1,0 \times 10^6$ espermatozóides/mL. Os óocitos e os

espermatozoides permaneceram em co-cultivo por 20 h em gotas de 100 μ L confeccionados com o meio Fert-TALP suplementado com 0,4% de BSA.

Finalmente, o CIV de grupos de 15 a 20 embriões foi realizado, durante 7 dias, em gotas de 100 μ L, com, em meio SOFaa suplementado com 10 % de SFB..

3.5 Preparação de Micropoços e CIV

Os micropoços dos sistemas WOW modificado (Figura 5A) e convencional (Figura 5B) foram confeccionados com a utilização de ponteiros metálicos, em placas de 4 poços (Nunc®, Roskilde, Dinamarca), contendo 400 μ L de meio SOFaa (BIO®), suplementado com 10% de SFB, cobertos com óleo mineral (Sigma), em atmosfera contendo 5%O₂, 5%CO₂ e 90%N₂, conforme os diferentes tamanhos de cada grupo experimental.

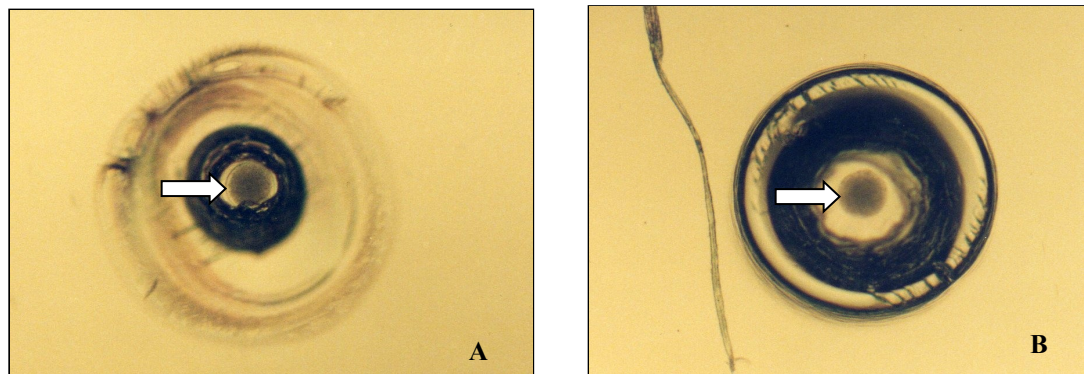


Figura 5 – (A) Estrutura reconstruída no sistema WOW modificado. (B) Estrutura no sistema WOW convencional (200X).

O dispositivo microfluídicos (Figura 6, 7A e 7B) foi confeccionado no Laboratório do Prof. Wheeler do Departamento de Zootecnia da Universidade de Illinois, EUA.

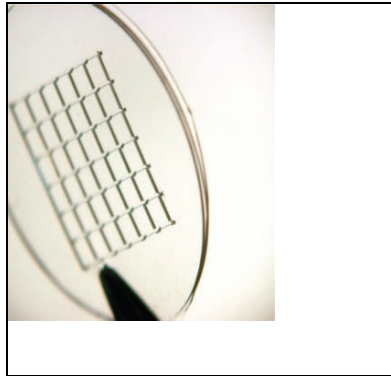


Figura 6 – Visão externa do dispositivo WOW (*well-of-the-well*) – PDMS.

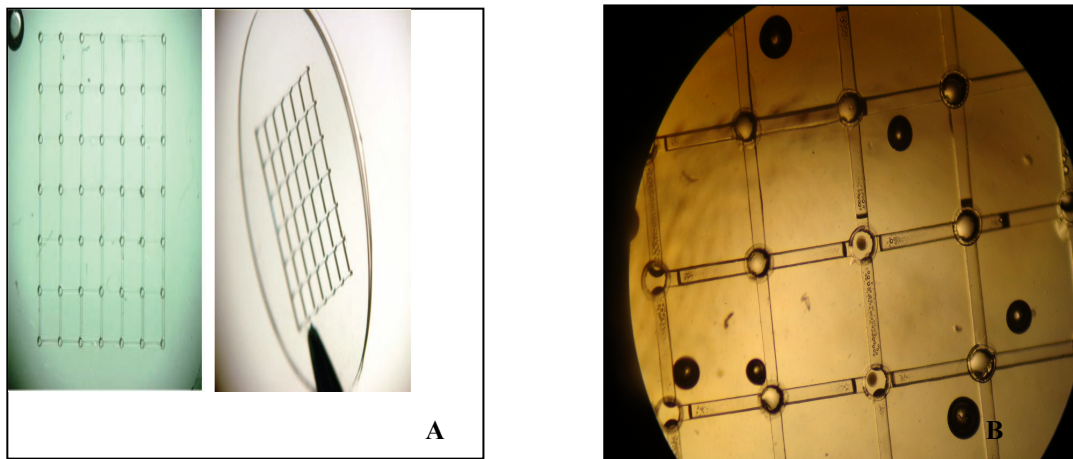


Figura 7 – (A) Visão geral do WOW (*well-of-the-well*) – PDMS (10X). (B) Estruturas reconstruídas no interior dos micropoços (20X).

3.6 Análise dos Dados

Os dados foram comparados entre os grupos pelo teste do χ^2 (Minitab, State College, PA, EUA), utilizando $P < 0,05$. As taxas de fusão foram avaliadas 60 min após a eletrofusão, as taxas de clivagem foram avaliadas 48 h após o início do CIV, as taxas de blastocisto foram avaliadas no dia 7 do CIV e as prenhezes foram diagnosticadas no dia 30 de desenvolvimento embrionário. As análises de eficiência relativa em cada grupo, também foram comparadas pelo teste do χ^2 , para $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Após 11 repetições, 3.876 oócitos foram selecionados para maturação, sendo que 3.437 (88,6%) apresentaram a extrusão do 1º corpúsculo polar. Após a digestão da ZP, 2.992 estruturas (77,1%) foram utilizadas na etapa de bissecção. Após a bissecção, 2.288 estruturas (59,0%) foram recuperadas e utilizadas na etapa de reconstrução. Foram reconstruídas, 1.011 estruturas sendo que 751 fusionaram (74,2%). Após a fusão, 715 estruturas foram ativadas e 705 foram colocadas em cultivo. Ao todo, entre todos os grupos de embriões clonados, 1.299 estruturas foram colocadas em cultivo, das quais 1.060 (81,6%) clivaram e 554 (42,6%) chegaram até o estágio de blastocisto. No grupo controle (FIV), 594 oócitos foram colocados em maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Destes, 483 (81,3%) clivaram e 315 (53,0%) alcançaram o estágio de blastocisto. Os resultados obtidos no desenvolvimento embrionário *in vitro* em cada grupo experimental são sumarizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Taxas de desenvolvimento de embriões FIV e clonados cultivados em diferentes sistemas de cultivo

Grupos	N	Clivagem (D2)		Blastocisto (D7)	
		N	%	n	%
Micropoço modificado	239	201	84,1	99 ^a	41,4
Micropoço convencional	232	190	81,9	72 ^b	31,0
Micropoço - PDMS	234	186	79,5	68 ^b	29,1
FIV (controle)	594	483	81,3	315 ^c	53,0 ^c

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

Não houve diferença entre os grupos na taxa de clivagem (Tabela 1). A taxa de desenvolvimento embrionário até blastocisto do G1 (micropoço modificado) foi superior ao G2 (micropoço convencional) e ao G3 (micropoço - PDMS; Figura 8). As taxas de blastocisto dos G2 e G3 foram semelhantes. Entretanto, a taxa de blastocisto do G1 foi inferior ao controle (FIV).

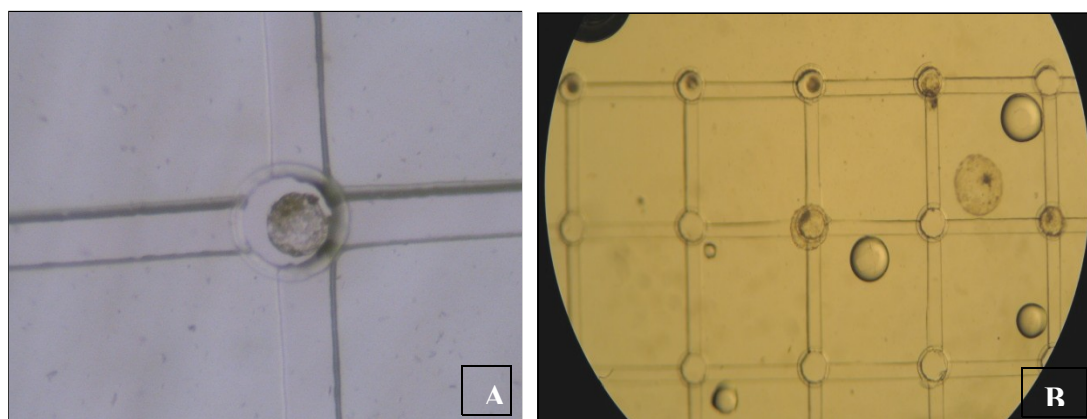


Figura 8 – Embriões no interior dos micropoços no sistema WOW-PDMS A (30X) e B (15X).

Foram transferidos 40 blastocistos de todos os grupos de embriões clonados, e após 30 dias, 20 fêmeas receptoras (50,0%) foram confirmadas prenhes mediante diagnóstico ultrassonográfico. Não houve diferença entre os grupos quanto à taxa de prenhez aos 30 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Taxas de prenhez no Dia 30 de gestação obtidas após a transferência de embriões bovinos clonados produzidos em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*

Grupos	Transferências		Taxa de prenhez*	
	n		n	%
Micropoço modificado	15		7	46,7
Micropoço convencional	13		7	53,9
Micropoço – PDMS	12		6	50,0

*Os dados de continuidade das gestações, além do Dia 30, não estão disponíveis (P> 0,05).

As eficiências relativas de produção de blastocistos ou estabelecimento de prenhez, baseadas no número total de CCOs dispostos em maturação *in vitro* ou de oócitos maturados, após a seleção pela presença do 1º corpúsculo polar, não diferiu entre os grupos de embriões clonados, conforme evidenciado na Tabela 3. Não obstante, a eficiência do grupo FIV (controle) em gerar blastocistos foi superior aos grupos de embriões clonados.

Tabela 3. Eficiência relativa (ER) dos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* quanto à produção de blastocistos ou estabelecimento de prenhez pelo número total de oócitos utilizados para a produção *in vitro* de embriões bovinos por HMC ou por FIV

Grupos Experimentais	Eficiência Relativa							
	Blastocisto				Prenhez			
	CCO ¹		Oócitos ²		CCO ³		Oócitos ⁴	
	Razão ⁵	%	Razão ⁵	%	Razão ⁵	%	Razão ⁵	%
Micropoço modificado	1:13,7	7,3	1:11,8	8,5	1:29,6	3,4	1:25,3	3,9
Micropoço convencional	1:18,3	5,5	1:15,7	6,4	1:34,8	2,9	1:29,8	3,4
Micropoço - PDMS	1:19,6	5,1	1:16,8	6,0	1:39,2	2,6	1:33,5	3,0
FIV (controle)	1:1,9	53,0 ^b	1:1,6	62,0 ^b	NA	NA	NA	NA

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

¹Proporção de blastocistos pelo total de complexos cumulus-oócito (CCOs) em MIV por grupo.

²Proporção de blastocistos pelo total de oócitos maturados por grupo.

³Proporção de prenhez pelo total de complexos cumulus-oócito (CCOs) em MIV por grupo.

⁴Proporção de prenhez pelo total de oócitos maturados por grupo.

⁵Refere-se ao número de CCOs ou oócitos maturados necessários para a produção de cada blastocisto ou prenhez, por grupo experimental.

NA: não aplicável; embriões derivados da FIV não foram transferidos a fêmeas receptoras.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que dentre as principais características buscadas em um sistema de cultivo está a necessidade de se criar um microambiente que maximize e mantenha os fatores embriotróficos e, concomitantemente, permita a difusão dos metabólitos produzidos pelos próprios embriões e das substâncias tóxicas produzidas principalmente por oócitos e embriões degenerados (KRISHER e WHEELER, 2010). Neste sentido, idealizou-se o sistema de cultivo micropoço – PDMS, o qual apresenta microcanais interligando os embriões entre si, pois se acredita que o uso de um ambiente dinâmico possa vir a proporcionar resultados superiores, por aproximar-se das condições verificadas no ambiente *in vivo*. No presente estudo, diferentes sistemas de cultivo derivados do sistema WOW (VATJA *et al.*, 2000) foram avaliados quanto à sua habilidade de produção embrionária *in vitro*, bem como quanto ao desenvolvimento *in vivo* subsequente.

Neste estudo, os micropoços modificados apresentaram melhores resultados na produção de blastocistos quando comparados aos demais grupos. Dentre as possíveis explicações está o fato de o poço modificado, por ter um diâmetro semelhante ao da ZP, proporcionou uma maior estabilidade para manutenção do estado de agregação dos blastômeros durante as primeiras clivagens, favorecendo a compactação e posterior formação da blastocèle. Os micropoços originais propostos por Vajta *et al.* (2000) apresentam dimensões de 280 μm de abertura e 250 μm na base (Figura 9A). Porém, as dimensões dos micropoços foram posteriormente modificadas e utilizadas neste estudo (FELTRIN *et al.*, 2006a), tendo sido reduzidas para 150 μm e 130 μm (Figura 9B), promovendo um maior desenvolvimento até o estágio de blastocisto que micropoços maiores. Estas dimensões reduzidas assemelham-se mais ao diâmetro do embrião com ZP (BOOTH *et al.*, 2001), mimetizando melhor a ZP, mantendo os blastômeros em contato estrito durante o processo de clivagem.

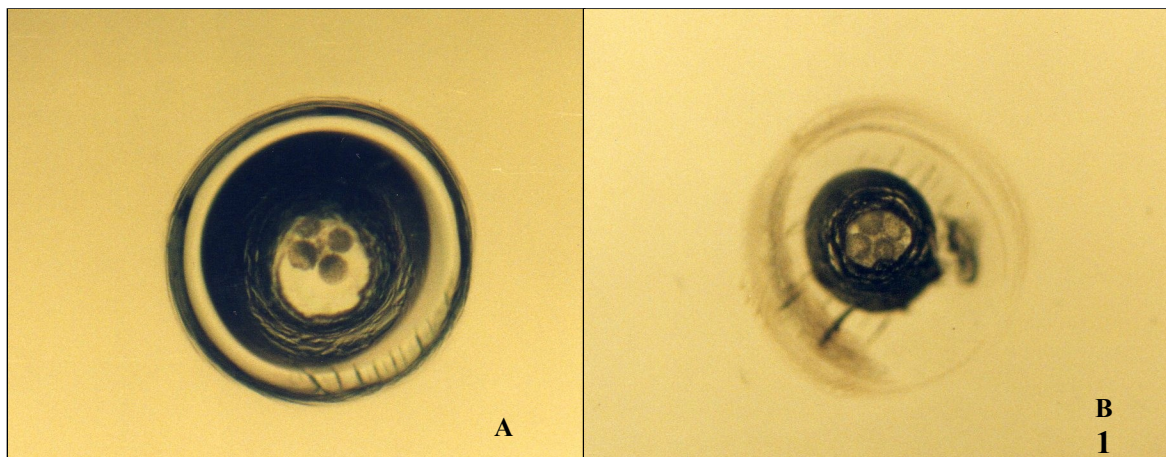


Figura 9 – (A) Clivagem em micropoço no sistema WOW (*well-of-the-well*) convencional. (B) Clivagem no sistema WOW (*well-of-the-well*) modificado (200X).

Sabe-se que o microambiente criado pelo sistema WOW permite uma maior concentração de fatores embriotróficos ao redor do embrião, o que pode compensar o menor número de embriões em um mesmo macro-ambiente (VATJA *et al.*, 2000). Portanto, em um microambiente mais restrito, como no caso dos micropoços modificados, poderia haver uma maior concentração de fatores autócrinos e parácrinos, os quais favoreceriam o desenvolvimento embrionário, conforme observado no grupo de micropoços modificados.

O sistema WOW modificado, também, pode mimetizar o ambiente intra-uterino, através do reduzido volume de meio no interior do micropoço, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Somado a isso, através da abertura dos micropoços poderia haver uma diluição dos metabólitos tóxicos. De fato, Hoelcker *et al.* (2009) verificaram que embriões com zona pelúcida produzidos por FIV e cultivados em poços com diâmetros maiores (500 μm) apresentaram melhores taxas de desenvolvimento quando comparados a poços menores (300 μm). Segundo os autores, dentre as possíveis explicações para os resultados obtidos estaria a maior concentração de metabólitos tóxicos e a diminuição do influxo de nutrientes para o micropoço com menor diâmetro. No entanto, o próprio grupo acredita que este achado não pode ser extrapolado para embriões desprovidos de ZP. No sistema WOW, a abertura no micropoço parece favorecer a remoção de tais metabólitos tóxicos, como a amônia e radicais livres, e concomitantemente, auxiliaria no aporte de nutrientes ao embrião em desenvolvimento (VAJTA *et al.*, 2005).

Muitas técnicas para cultivo *in vitro* de embriões foram descritas nos últimos anos (LANE e GARDNER, 1992; KATO e TSUNODA, 1994; BLONDIN e SIRARD, 1995; HAZELEGER *et al.*, 1995; CAROLAN *et al.*, 1996; O'DOHERTY *et al.*, 1997; WHEELER *et al.*, 2007). Utilizando microcapilares de vidro, Thouas *et al.* (2001) desenvolveram o sistema GO (*glass oviduct*), apresentando melhores resultados para cultivo individual de embriões, quando comparado ao de microgotas (THOUAS *et al.*, 2001; VAJTA *et al.*, 2001, 2005). Entretanto, o desenvolvimento individual dos embriões, em geral, resulta em taxas inferiores de formação de blastocistos, que apresentam uma redução no número total de células quando comparado aos embriões cultivados em grupos (PARIA e DEY, 1990). A conseqüente diminuição da densidade embrionária, evidenciada no sistema de cultivo individual, causa uma redução na taxa de compactação, na taxa de eclosão, no número de células da massa interna e do trofotoderma (STODDART *et al.* 1996), na cavitação (WILEY *et al.* 1986; PARIA e DEY, 1990) e uma menor taxa de implantação em camundongos (LANE e GARDNER, 1992). Kurahna e Niemann (2000) verificaram que além do aumento da taxa de blastocisto e do número total de células nos embriões produzidos em grupos, existe ainda o aumento na produção de interferon-tau.

Dentre os sistemas utilizados para cultivo individual, mas submetidos a um ambiente de grupo, o sistema WOW vem apresentando os melhores resultados, podendo ultrapassar os 50% de desenvolvimento a blastocisto (VAJTA *et al.*, 2000, 2003), sendo semelhante ao cultivo em grupo de embriões com ZP (BOOTH *et al.*, 2001). Não obstante, apesar de satisfatórias, as taxas de desenvolvimento dos embriões clonados até o estágio de blastocisto neste estudo foram menores do que o grupo controle (FIV), com ZP, que foi superior a 50%. A presença ou ausência da ZP não deve ter sido o fator causal desta diferença em desenvolvimento, já que Bertolini *et al.* (2006), Ribeiro *et al.* (2009) e Mezzalira (2009), em estudos com distintos objetivos, demonstraram paralelamente que a ausência da ZP não somente não compromete o desenvolvimento de embriões FIV em cultivo, mas também é compatível com o desenvolvimento ao estágio de blastocisto em taxas superiores para embriões ativados partenogeneticamente.

SHAH *et al.* (2008) verificaram que o cultivo de embriões clones bubalinos produzidos pela técnica de HMC foi significativamente superior no grupo cultivado no WOW convencional quando comparados a microgotas de 5 µL. Entretanto, naquele experimento, os autores observaram uma maior taxa de formação de blastocistos

quando os embriões foram cultivados em grupos de 15 embriões sem o sistema WOW convencional (40,3% vs. 19,1%). Em adição, os pesquisadores também verificaram que os embriões sem ZP cultivados em sistemas sem micropoços agregavam-se quando cultivados em grupos acima de 30 embriões. Em experimento realizado por Vajta *et al.* (2000), não houve diferença entre as taxas de formação de blastocistos de embriões cultivados em microgotas ou em micropoços.

Sistemas estáticos e dinâmicos de cultivo *in vitro* de embriões têm sido comparados por vários grupos de pesquisadores, revelando possibilidades promissoras e favoráveis ao desenvolvimento, de acordo com as características de cada procedimento. No sistema dinâmico com duas vazões (0,1 e 0,5 μLh^{-1}), por exemplo, o desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi menor do que o sistema de cultivo microfluidico estático e em microgotas (HICKMAN *et al.*, 2002). Naquele mesmo estudo, verificou-se o benefício de um fluxo mais elevado (5 μLh^{-1}) nas primeiras 24 h de cultivo sobre o desenvolvimento embrionário. Isso evidencia a possibilidade de que taxas de fluxo diferentes, em diferentes tempos de desenvolvimento, podem ser necessárias para o desenvolvimento embrionário ideal. Cabrera *et al.* (2008) demonstraram que a dinâmica de fluxo de fluidos de pelo menos 48 h durante o cultivo melhoraram o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, em murinos e bovinos, quando comparados com o cultivo estático. Dispositivos microfluidicos controlados por computador têm permitido o controle preciso do fluxo de meio (GU *et al.*, 2004) e podem, potencialmente, serem utilizados em estudos controlados de fluxo dinâmico. Um dispositivo adicional, com entradas e saídas múltiplas, tem sido utilizado para a avaliação do perfil metabólico embrionário (URBANSKI *et al.*, 2008).

O sistema de microcanais em PDMS proposto pelo presente estudo poderia permitir uma maior difusão entre os fatores parácrinos produzidos pelos embriões, com um conseqüente incremento nas taxas de desenvolvimento embrionário. Por outro lado, estes fatores podem estar dispersos no interior dos micro-canais, diminuindo, assim, os efeitos parácrinos e, conseqüentemente, seus efeitos positivos sobre as taxas de desenvolvimento embrionário, como observado neste estudo. Yuan e Krisher (2010; dados não publicados), cultivaram embriões murinos, suínos e bovinos com o sistema WOW-PDMS com e sem microcanais. Os autores não encontraram diferença significativa entres os grupos. No entanto, os autores mostraram que, em alguns experimentos, o cultivo com microcanais aumentou o número de células dos embriões.

A utilização de corantes pode ser uma boa ferramenta para se aferir a movimentação dos fluidos entre os microcanais. Além disso, poder-se-ia reduzir as distâncias entre os micropoços, reduzindo, assim, o volume de meio no interior dos microcanais, como forma de se viabilizar um maior fluxo de fatores embriotróficos. Neste sentido, torna-se claro que novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de se avaliar o real benefício dos microcanais para o desenvolvimento embrionário.

Durante este experimento algumas falhas no sistema WOW-PDMS foram identificadas, as quais podem ter contribuído para uma menor taxa de formação de blastocistos, quando comparado ao grupo WOW modificado. Algumas estruturas, durante o processo de clivagem, encontravam-se presas no interior dos microcanais (Figura 10) devido ao tamanho dos mesmos (aproximadamente 80 μm).

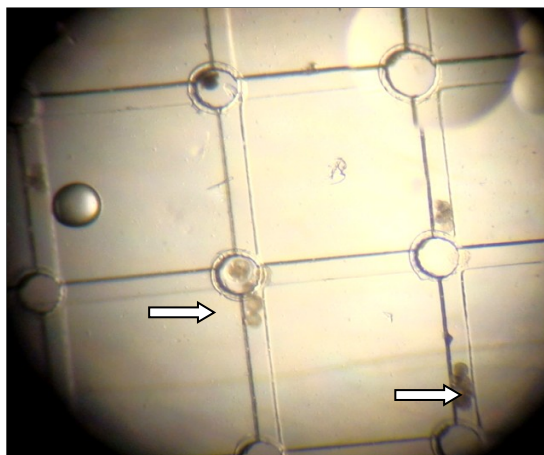


Figura 10 – Estruturas clivadas no interior dos microcanais.

Desta forma, houve uma maior probabilidade de desagregação de blastômeros e mesmo de efeitos físicos deletérios ao embrião alojado nos microcanais. Como alternativa sugere-se a diminuição dos microcanais para 30 μm , como forma de impedir o aprisionamento das estruturas reconstruídas no interior dos mesmos com conseqüente perda celular e de desenvolvimento. Além disso, uma diminuição no tamanho dos micropoços bem como a diminuição da distância entre eles, também poderia ser benéfica, como forma de permitir uma melhor concentração dos fatores embriotróficos nas proximidades dos embriões circunvizinhos por uma maior difusão destes fatores através dos microcanais.

Em conformidade com o esperado, o grupo FIV (controle) foi mais eficiente em gerar blastocistos em relação aos grupos de embriões clonados. A FIV necessita cerca

de nove vezes menos CCOs ou oócitos maturados para a produção do mesmo número de blastocistos, que o exigido para a clonagem por HMC, sendo semelhante ao observado por Ribeiro *et al.* (2009). Porém, é importante salientar que a clonagem manual requer a utilização de dois hemi-citoplastos para a reconstrução de um embrião clone, o que já reduz pela metade a eficiência da técnica, quando comparado à FIV. Em adição, sabe-se que a manipulação *in vitro* durante a clonagem exerce um efeito deletério no desenvolvimento subsequente, como demonstrado em experimentos com clonagem manual (MEZZALIRA, 2009). Por sua vez, as eficiências relativas entre os grupos clonados não diferiram, apesar do grupo dos micropoços modificados apresentar maior taxa de formação de blastocistos, o que poderia traduzir-se por uma maior eficiência final para este grupo. Porém, o baixo número de transferências de embriões para fêmeas receptoras, por grupo, talvez não tenha permitido a expressão *in vivo* da diferença *in vitro* observada entre os grupos. Esta argumentação foi recentemente empregada por Hansen *et al.* (2010), os quais descreveram a dificuldade de se averiguar uma real diferença entre dois tratamentos de cultivo ou produção *in vitro* de embriões, com possível efeito no desenvolvimento *in vivo* subsequente, quando o estudo baseia-se em um número pequeno de transferências, o que compromete o poder da análise estatística. Segundo os autores (HANSEN *et al.*, 2010), um número mínimo ideal de receptoras por grupo experimental, neste tipo de estudo, para que diferenças apareçam em 70% das vezes, seria de no mínimo de 300 animais por grupo, o que inviabiliza a execução de experimentos com resultados *in vivo* conclusivos, sendo o número de transferências provavelmente a causa da ausência de diferenças estatisticamente comprováveis entre os grupos experimentais neste estudo. Esta dificuldade, no entanto, também já foi abordada por outros autores (TECIRLIOGLU *et al.*, 2005), não sendo exclusivo para este estudo.

6 CONCLUSÃO

Dentre os três sistemas de cultivo *in vitro* testados para embriões bovinos clonados e sem zona pelúcida (ZP) no presente experimento, o WOW modificado (micropoços reduzidos em formato cônico) proporcionou maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto que os sistemas WOW convencional e com micro-canais de PDMS por permitir que haja um microambiente mais favorável ao desenvolvimento *in vitro*. Porém, o desenvolvimento *in vivo*, manifestado pela avaliação das taxas de prenhez aos 30 dias, bem como a eficiência relativa para a produção de blastocistos ou o estabelecimento de prenhez subsequentes à transferência a fêmeas receptoras, não diferiu entre os grupos experimentais de embriões clonados por HMC.

7 PERSPECTIVAS

Sabe-se que a taxa de clivagem e a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* permanecem inferiores às verificadas no sistema *in vivo*, indicando que o formato *in vitro* tradicional necessita de ajustes. Nesse sentido, é imprescindível aprofundar a pesquisa sobre sistemas de cultivos alternativos, bem como sobre a dinâmica de fluxo, a fim de otimizar o sistema de CIV tradicional. O êxito no CIV de embriões, mediante melhores taxas de clivagem, seria benéfico tanto para infertilidade humana, como também para a conservação de espécies da vida selvagem.

O sistema de CIV ideal deveria ser dinâmico alterando sua composição à medida que ocorre o desenvolvimento do embrião, mimetizando o que ocorre *in vivo* ao longo do trato reprodutivo da fêmea, mas infelizmente, este fluxo contínuo tem sido de difícil obtenção. Isto poderia ser parte da razão pela qual, apesar das melhorias significativas na composição dos meios, o desenvolvimento *in vitro* ainda é ineficiente e resulta frequentemente em embriões com potencial de desenvolvimento sub-ótimo.

Outro aspecto do sistema de cultivo atual que poderia evoluir diz respeito à intensa manipulação dos gametas e embriões. As células são manipuladas diversas vezes, sendo expostas às alterações estressantes de temperatura, pH e condições adversas de osmolaridade. As tensões mecânicas impostas durante a PIV de embriões, por exemplo, durante a remoção de células do *cumulus*, também não são bem compreendidas, mas é provável que sejam prejudiciais. Além do erro humano, pode acontecer adicionalmente a contaminação do sistema de cultivo.

Uma plataforma microfluídica para PIV representa uma significativa mudança de paradigma nas propriedades físicas dos sistemas de cultivo de gametas e de embriões (WHEELER *et al.* 2007).

Plataformas microfluídicas podem resultar na redução do estresse para o embrião, pois o seu desenvolvimento ocorre em um sistema fechado com os parâmetros de pH, temperatura e osmolaridade controlados. Além disso, as mudanças do meio podem ser realizadas por robôs. Sendo assim, o estresse mecânico sobre o embrião seria bastante reduzido. O uso de dispositivos microfluídicos, não só eliminaria o estresse

sobre os gametas e embrião, como também eliminaria o erro humano da equação. Dispositivos microfluídicos permitiriam ao oócito, ou ao embrião, exposição a múltiplos fluxos, tornando possível a introdução de novos meios de comunicação para manipulações experimentais.

O controle do meio e a circulação de embriões dentro dos dispositivos microfluídicos poderiam ser totalmente automatizados, dispensando a manipulação humana. Isso levaria a condições de cultivo uniformes e para tornar-se uma realidade os fisiologistas devem trabalhar estreitamente com os engenheiros. Atualmente protótipos de tais dispositivos estão sendo fabricados. É preciso avançar em pesquisas adicionais para desenvolver plenamente este conceito de PIV em uma única plataforma microfluídica.

Em última análise, um ambiente físico de dispositivos de cultivo microfluidico apresenta-nos a oportunidade de investigar vários parâmetros da fisiologia dos gametas e embriões, como, por exemplo, físicos e químicos, que atualmente não são possíveis.

Uma vez que os dispositivos sejam projetados, fabricados, testados e aprovados, deve-se buscar a produção em larga escala para torná-los mais baratos e facilmente disponíveis para diferentes laboratórios. Apesar dos muitos desafios, o estágio atual da tecnologia microfluídica sugere que o desenvolvimento de tais dispositivos é realista e algo acessível nos próximos anos.

Finalmente, a **variedade de dispositivos microfluídicos fabricada até o momento mostra a flexibilidade e facilidade do processo de fabricação, tornando infinitas as alternativas que podem ser propostas com esta nova tecnologia.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGUISI, A., BEHBOODI, E., MELICAN, D.T., POLLOCK, J.S., DESTREMPES, M.M., CAMMUSSO, 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 Biotech.** v.17, p. 456-461, 1999.

BATCHELDER, C.A., HOFFERT, K.A., BERTOLINI, M., MOYER, A.L., MASON, J.B., PETKOV, S.G., FAMULA, T.R., ANDERSON, G.B. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. **Cloning Stem Cells.** v. 7, p. 238- 254, 2005.

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

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

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum. Reprod. Update.** v.1, p. 91–148, 1995.

BEEBE, D. J., MENSING, G. A., ANDWALKER, G. M. Physics and applications of microfluidics in biology. **Annu. Rev. Biomed.** v. 4, p. 261–286, 2002.

BERTOLINI, M., MASON, J.B., BEAM, S.W., CARNEIRO, G.F., SWEEN, M.L., MOYER, A.L., FAMULA, T.R., SAINZ, R.D., ANDERSON, G.B. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology.** v. 58, p. 973-994, 2002a.

BERTOLINI, M., BEAM, S.W., SHIM, H., BERTOLINI, L.R., MOYER, A.L., FAMULA TR, ANDERSON, G.B. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro- produced day 7 and 16 bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.** v. 63, p. 318-328, 2002b.

BERTOLINI, M., BERTOLINI, L.R., PETKOV, S.G., MADDEN, K.R., MURRAY, J.D., ANDERSON, G.B. Embryo survival following lipid-based transfection of 1-cell stage bovine embryos with small interfering RNA (siRNA) fragments and/or DNA. **Reprod. Fertil. Dev.** v.18, p. 168, 2006.

BERTOLINI, M., BERTOLINI, L.R., GERGER, R.P.C., BATCHELDER, C.A., ANDERSON, G.B. Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 31, p. 391-405, 2007.

BLONDIN, P., SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol Reprod Dev.**, v.41, 54-62, 1995.

BOOTH, P.J., TAN, S.J., REIPURTH, R., HOLM, P., CALLESEN, H. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. **Cloning Stem Cells.** v.3, p.139–150, 2001.

BORMANN, C. L., WHEELER, M. B., BEEBE, D. J., TAKAYAMA, S., AND SMITH, G.D. Microfluidics for assisted reproductive technologies. In 'Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications'. Eds A. Khademhosseini, J. Borenstein, S. Takayama e M. Toner., p. 209–225, 2008a.

BORMANN, C. L., CABRERA, L. M., HEO, Y. S., KATO, N., TAKAYAMA, S., AND SMITH, G. D. Development of bovine blastocysts following *in vitro* oocyte maturation on a dynamic microfluidic platform. **Fertil. Steril.** v. 90, p.112-114, 2008b.

BOURC'HIS, D., LE BOURHIS, D., PATIN, D., NIVELEAU, A., COMIZZOLI, P., RENARD, J.P., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Curr. Biol.** v.11, p.1542-1546, 2001.

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

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.38, p. 455–463, 1952.

CABRERA, L. M., BORMANN, C. L., HEO, Y. S., TAKAYAMA, S., SMITH, G. D. Improved embryo development with microfluidic dynamic culture is exposure time-dependent, developmental stage-independent and oxygen-independent. **Fertil. Steril.** v.90, p.95- 99, 2008.

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

CAMPBELL, K.H.S., FISHER, P., CHEN, W.C., CHOI, I., KELLY, R.D.W., LEE, J.H., XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology.** v. 68, p. 214-231, 2007.

CAROLAN, C., LONERGAN, P., KHATIR, H., MERMILLOD, P. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v. 45, p.145–150, 1996.

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

CLARK, S. G., HAUBERT, K., BEEBE, D. J., FERGUSON, C. E., WHEELER, M. B. Reduction of polyspermic penetration using biomimetic microfluidic technology during *in vitro* fertilization. **Lab. Chip.** v.5, p.1229–1232, 2005.

COLLEONI, S., DONOFRIO, G., LAGUTINA, I., DUCHI, R., GALLI, C., LAZZARI, G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. **Cloning Stem Cells.** v.7, p.154-66, 2005.

CONSTANT, F., GUILLOMOT, M., HEYMAN, Y., VIGNON, X., LAIGRE, P., SERVELY, J.L., RENARD, J.P., PALMER, C. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biol. Reprod.** v.75, p.122-130, 2006.

DU, Y., KRAGH, P.M., ZHANG, Y. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. **Theriogenology.** v.68, p. 1104–1110, 2007.

FAAST, R., HARRISON, S.J., BEEBE, L.F., MCILFATRICK, S.M., ASHMAN, R.J., NOTTLE, M.B. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. **Cloning Stem Cells.** v. 8, p. 166-73, 2006.

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

FELTRIN, C., FORELL, F., SANTOS, L.C., RODRIGUES, J.L. *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by HMC using a modified WOW culture system. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 18, p. 126, 2006a.

FELTRIN, C., FORELL, F., ARRUDA, N.S., SILVA, D.S., QUEIROZ, L.M.V., PEIXER, M.A.S., MALARD, P.F., SANTANA, G.M., RODRIGUES, J.L. Cultivo de embriões clones bovinos produzidos a partir de diferentes células doadoras em sistema WOW modificado. **Acta Sc. Et.** v. 34, p. 279, 2006b.

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

FORELL, F., FELTRIN, C. SANTOS, L. C., COSTA, U. M., VIEIRA, A. D., HÖLKER, M., RODRIGUES, J. L. Otimização do sistema de produção de clones por transferência nuclear de célula somática (NTSC). **Acta Sc. Vet.** v. 36, p. 221 – 228, 2008.

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

GANDOLFI, F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. **Theriogenology**. v. 41, p. 95–100, 1994.

GARDNER, D. K., e LEESE, H. J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** v. 88, p. 361–368, 1990.

GARDNER, D. K., LANE, M., CALDERON, I., e LEETON, J. Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. **Fertil. Steril.** v. 65, p.349–353, 1996.

GARDNER, D. K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**. v. 49, p. 83–102, 1998a.

GARDNER, D. K. Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts. **Hum. Reprod.** v. 13, p. 218–225, 1998b.

GARDNER, D. K. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p. 87-89, 1999.

GLASGOW, I. K., ZERINGUE, H. C., BEEBE, D. J., CHOI, S.-J., LYMAN, J. T., CHAN, N. G., WHEELER, M.B. Handling individual mammalian embryos using microfluidics. **IEEE Trans. Biomed. Eng.** v. 48, p. 570–578, 2001.

GÓMEZ, M.C., POPE, C.E., GIRALDO, A., LYONS, L.A., HARRIS, R.F., KING, A.L., COLE, A., GODKE, R.A., DRESSER, B.L. Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. **Cloning Stem Cells**. v. 6, p. 247-258, 2004.

GU, W., ZHU, X., FUTAI, N., CHO, B., AND TAKAYAMA, S. Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v. 15, p. 861- 866, 2004.

GURDON, J.B., BYRNE, J.A. The first half-century of nuclear transplantation. **Biosci. Rep.** v. 24, p. 545-547, 2004.

HANSEN, P. J., BLOCK, J., LOUREIRO, B., BONILLA, L., HENDRICKS, K.E.M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reprod. Fert. Develop.**, v.22, p. 59-66, 2010.

HARDY, K., HOOPER, M. A., HANDYSIDE, A. H., RUTHERFORD, A. J., WINSTON, R. M., AND LEESE, H. J. Non-invasive measurement of glucose and

pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. **Hum. Reprod.** v. 4, p. 188–191, 1989.

HAZELEGER, N.L., HILL, D.J., STUBBING, R.B., WALTON, J.S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology.** v. 43, p. 509–522, 1995.

HEO, Y. S., CABRERA, L. M., SONG, J. W., FUTAI, N., TUNG, Y.-C., SMITH, G. D., TAKAYAMA, S. Characterization and resolution of evaporation-mediated osmolality shifts that constrain microfluidic cell culture in poly(dimethylsiloxane) devices. **Anal. Chem.** v. 79, p. 1126–1134, 2007.

HICKMAN, D. L., BEEBE, D. J., RODRIGUEZ-ZAS, S. L., AND WHEELER, M. B.. Comparison of static and dynamic medium environments for culturing of pre-implantation mouse embryos. **Comp. Med.** v. 52, p.122-126, 2002.

HILL, J.R. & CHAVATTE-PALMER, P. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. Principles of Cloning. **Academic Press.** p. 247-266, 2002.

HOELKER, M., RINGS, F., LUND, Q., GHANEM, N., PHATSARA, C., GRIESE, J., SCHELLANDER, K., TESHAYE, D. Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured *in vitro* . **Reproduction.** v.137, p. 415–425, 2009.

HOLM, P., BOOTH, P.J., VAJTA, G., CALLESEN, H. A protein-free SOF system supplemented with amino-acids, sodium citrate and myoinositol for bovine embryo culture. Proc 13th. **Sci Meet Eur Embryo Trans Assoc.** Lyon, France. p. 158, 1998.

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

JAISWAL, N., HAYNESWORTH, S.E., CAPLAN, A.I., BRUDER, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. **J. Cell Biochem.** v. 64, p. 295-312, 1997.

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

KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effects of the culture density of mouse zygotes on the development *in vitro* and *in vivo*. **Theriogenology,** v. 41, p. 1315-1322, 1994.

KATO, Y., TANI, T., SOTOMARU, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science** v. 282, p. 2095–2098, 1998.

KATO, Y., TANI, T., TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J. Reprod. Fertil.** v.120, p. 231–237, 2000.

KATO, Y., IMABAYASHI, H., TANI, T., TANIGUCHI, M., MATSUMOTO, M., UMEZAWA, A., TSUNODA, Y. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: development totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. **Biol. Reprod.** v.70, p. 415–418, 2004.

KHURANA, N.K., NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.** v. 62, p. 847–856, 2000.

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

KRISHER, R. L., WHEELER, M. B. Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. **Reprod., Fertil. and Development.** v. 22, p. 32–39, 2010.

KUMAR, B.M., YOO, J.G., OCK, S.A., KIM, J.G., SONG, H.J., KANG, E.J., CHO, S.K., LEE, S.L., CHO, J.H., BALASUBRAMANIAN, S., RHO, G.J. *In vitro* differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from porcine umbilical cord blood. **Mol Cells.** v. 24, p. 343-350, 2007.

LAGUTINA, I., LAZZARI, G., DUCHI, R. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. **Reproduction.** v.130, p. 559–567, 2005.

LANE, M., GARDNER, D. K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. **Hum. Reprod.** v.7, p. 558–562, 1992 .

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

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

LEESE, H. J., AND ALDRIDGE, S. The movement of pyruvate, lactate and lactate dehydrogenase into rabbit oviductal fluid. **J. Reprod. Fertil.** v. 56, 1979.

LEESE, H. J., ALDRIDGE, S., AND JEFFRIES, K. S. The movement of amino acids into rabbit oviductal fluid. **J. Reprod. Fertil.** v.56, p.623–626, 1979a.

LEESE, H. J.,ALDRIDGE, S., AND KIERNAN,T. Glucose movement into rat uterine fluid. **J. Reprod. Fertil.** v.56, p. 615-618, 1979b.

LEESE, H. J. Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. **Q. J. Exp. Physiol.** v. 68, p.89–96, 1983.

LEESE, H. J. The formation and function of oviduct fluid. **J. Reprod. Fertil.** v. 82, p. 843–856, 1988.

LEESE, H. J. Human embryo culture: back to nature. **J. Assist. Reprod. Genet.** v.15, p. 466–468, 1998.

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

LOEFFLER, C.S. POTTEN. Stem cells and cellular pedigrees - a conceptual introduction, **Stem Cells**, Stem Cells, Potten CS (Ed.), Academic Press, Cambridge: p. 1-27, 1997.

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

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., AND BOLAND, M. P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. **RBM Online.** v. 7, p. 657–663, 2003a.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., AND BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Domest. Anim.** v. 38, p. 259–267, 2003b.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., MOREIRA, P. M., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M. P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.** p. 69, 2003c.

LONERGAN, P., RIZOS, D., KANKA, J., NEMCOVA, L., MBAYE, A. M., KINGSTON, M., WADE, M., DUFFY, P., AND BOLAND, M. P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction.** v. 126, p. 337–346, 2003d.

MELIN, J., LEE, A., FOYGEL, K., LEONG, D. E., QUAKE, S. R., AND YAO, M. W. M. In vitro embryo culture in defined, sub-microliter volumes. **Dev. Dyn.** 238, 950–955, 2009.

MEZZALIRA, J.C. **Dissertação de mestrado:** Efeito da heteroplasma na densidade celular e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos clonados por transferência nuclear de célula somática. Lages: UDESC, Faculdade de Veterinária, p. 48, 2009.

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

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

OBACK, B., and WELLS, D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. **Cloning Stem Cells**. v. 4, p. 147-168, 2002.

O'DOHERTY, E.M., WADE, M.G., HILL, J.L., BOLAND, M.P. The role of oocyte numbers in culture on development of bovine oocytes in an *in vitro* system. **Theriogenology**. v.47, p. 296, 1997.

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

PARIA, B. C.; DEY, S. K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interaction among embryos and role of growth factors. Proceedings of National Academy Sciences, Washington, USA. v. 87, p. 4756-4760, 1990.

PEDERSEN, H.G., SCHMIDT, M., SANGILD, P.T., STROBECH, L., VAJTA, G., CALLESEN, H., GREVE, T. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. **Mol Cell Endocrinol**. v.234, p. 137-143, 2005.

PEURA, T.T., LEWIS, I.M., TROUNSON, A.O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. **Mol Reprod Dev**. v. 50, p. 185-191, 1998.

PEURA, T.T. Improved *in vitro* development rates of sheep somatic cell nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning methods. **Cloning Stem Cells**. v.5, p. 13-24, 2003.

POLEJAEVA, I.A., CHEN, S.H., VAUGHT, T.D. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**. v. 407, p. 86-90, 2000.

RATY, S., WALTERS, E. M., DAVIS, J., ZERINGUE, H., BEEBE, D. J., RODRIGUEZ-ZAS, S. L., AND WHEELER, M. B. Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture. **Lab. Chip**. v.4, p. 186-190, 2004.

RENARD, J.P., CHASTANT, S., CHESNÉ, P., RICHARD, C., MARCHAL, J., CORDONNIER, N., CHAVATTE, P., VIGNON, X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **The Lancet**. v. 353, p. 1489-1491, 1999.

RIBEIRO, E.S., GERGER, R.P.C., OHLWEILER, L.U., ORTIGARI, I., MEZZALIRA, J.C., FORELL, F., BERTOLINI, L. R., RODRIGUES, J.L., AMBRÓSIO, C.E., MIGLINO, M. A., MEZZALIRA, A., BERTOLINI, M. Developmental potential of bovine handmade cloned embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. **Cloning Stem Cells**. v.11, p. 377-386, 2009.

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

SHAH, R.A., GEORGE, A., SINGH, M.K., KUMAR, D., CHAUHAN, M.S., MANIK, R., PALTA, P., SINGLA, S.K. Hand-made cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: comparison of different media and culture systems. **Cloning Stem Cells**. v. 10, p. 435–442, 2008.

SHAH, R.A., GEORGE, A., SINGH, M.K., KUMAR, D., ANAND, T., CHAUHAN, M.S., MANIK, R.S., PALTA, P., SINGLA, S.K. Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**. v. 71, p. 1215-1219, 2009.

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

SMITH, G. D., AND TAKAYAMA, S. Gamete and embryo isolation and culture with microfluidics. **Theriogenology**. v. 68, p. 190–195, 2007.

STODDART, N.R., WILD, A.E., FLEMING, T.P. Stimulation of development *in vitro* by platelet-activating factor receptor ligands released by mouse preimplantation embryos. **J. Reprod. Fertil.** v. 108, p. 47–53, 1996.

SUH, R. S., PHADKE, N., OHL, D. A., TAKAYAMA, S., SMITH, G. D. Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. **Hum. Reprod. Update**. v. 9, p. 451–461, 2003.

SUN, Y.H., CHEN, S.P., WANG, Y.P., H.U, W., ZHU, Z.Y. Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs. **Biol. Reprod.** v. 72, p. 510-515, 2005.

TAGARELLI, A., PIRO, A., LAGONIA, P., TAGARELLI, G. Hans Spemann. One hundred years before the birth of experimental embryology. **Anat. Histol. Embryol.** v. 33, p. 28-32, 2004.

TAKA, M., IWAYAMA, H., FUKUI, Y. Effect of the well of the well (WOW) system on *in vitro* culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection. **J. Reprod. Dev.** v. 51, p. 533–537, 2005.

TECIRLIOGLU, R.T., COONEY, M.A., LEWIS, I.M. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 17, p. 573–585, 2005.

- THOUAS, G.A., KORFIATIS, N.A., FRENCH, A.J., JONES, G.M., TROUNSON, A.O. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. **Reprod. Biomed Online.** v. 3, p. 25-29, 2001.
- URBANSKI, J. P., JOHNSON, M. T., CRAIG, D. D., POTTER, D. L., GARDNER, D. K., AND THORSEN, T. Noninvasive metabolic profiling using microfluidics for analysis of single preimplantation embryos. **Anal. Chem.** v. 80, p. 6500–6507, 2008.
- VAJTA, G., PEURA, T.T., HOLM, P., PALDI, A., GREVE, T., TROUNSON, A.O., CALLESEN H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. **Mol. Reprod. Dev.** v. 55, p. 256-264, 2000.
- VAJTA, G., LEWIS, I.M., HYTTEL, P., THOUAS, G.A., TROUNSON, A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning.** v.3, p. 89-95, 2001.
- VAJTA, G., LEWIS, I.M., KORTIATIS, N.A., TRAVERS, R.L., TROUNSON, A.O. Bovine somatic cell cloning without micromanipulators: optimization of certain parameters. **Reprod Fertil Dev.** v.57, p. 453, 2002.
- VAJTA, G., LEWIS, I.M., TROUNSON, A.O., PURUP, S., MADDUX-HYTTEL, P., SCHMIDT, M., PEDERSEN, H.G., GREVE, T., CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. **Biol Reprod.** v. 68, p. 571-578, 2003.
- VAJTA, G., KRUGH, P.M., MTANGO, N.R., CALLESEN, H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. **Reprod Fertil Dev.** v.17, p. 97-112, 2005.
- VAJTA, G., KOROSI, T., DU, Y., NAKATA, K., IEDA, S., KUWAYAMA, M., AND NAGY, Z. P. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. **Reprod. Biomed. Online.** v.17, p. 73–81, 2008.
- VOGEL, G. Cloned Gaur a Short-Lived Success. **Science.** v. 291, p. 409, 2001.
- WAKAYAMA, T., PERRY, A.C., ZUCCOTTI, M. Fullterm development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature.** v. 394, p. 369–374, 1998.
- WALKER, S.K., HARTWICH, K.M., SEAMARK, R.F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology.** v. 45, p.111-120, 1996.
- WALTERS, E. M., CLARK, S. G., BEEBE, D. J., AND WHEELER, M. B. Mammalian embryo culture in a microfluidic device. In ‘Methods in Molecular Biology, v. 254; Germ Cell Protocols, v. 2: Molecular Embryos Analysis. p. 375–381, 2004.
- WANI, N.A., WERNERY, U., HASSAN, F.A., WERNERY, R., SKIDMORE, J.A. 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. **Biol. Reprod.** v. 82, p. 373-379, 2010.

WELLS, D.N., LAIBLE, G., TUCKER, F.C., MILLER, A.L., OLIVER, J.E., XIANG, T., FORSYTH, J.T., BERG, M.C., COCKREM, K., L'HUILLIER, P.J., TERVIT, H.R., OBACK, B. Coordination between donor cell type and cell cycle improves nuclear cloning efficiency in cattle. **Theriogenology**. v. 59, p. 45-59, 2003.

WELLS, D.N., FORSYTH, J.T., MCMILLAN, V., OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells**. v.6, p. 101-110, 2004.

WHEELER, M.B., CLARK, S.G., BEEBE, D.J. Developments in *in vitro* technologies for swine embryo production. **Reprod. Fertil. Dev.** v.16, p. 15–25, 2004.

WHEELER, M. B., WALTERS, E. M., BEEBE, D. J. Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction. **Theriogenology**. v. 68, p.178-189, 2007.

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

WILEY, L. M.; YAMANI, S.; VAN MUYDEN, D., Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 45, p. 111-119, 1986.

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

WILSON, J.M., WILLIAMS, J.D., BONDIOLI, K.R., LOONEY, C.R., WESTHUSIN, M.E., MCCALLA, D.F. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim. Reprod. Sci.** v.38, p. 73-83, 1995.

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

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

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARWATH, J.W., NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Mol. Reprod. Dev.** v. 53, p. 8-18, 1999.

ZERINGUE, H. C., KING, K. R., GLASGOW, I. K., RATY, S., WHEELER, M. B., E BEEBE, D. J. Zona pellucida removal of mammalian embryos in a microfluidic system. In 'Proceedings of the Fourth International Symposium on MicroTotalAnalysis Systems (μ TAS), The Netherlands'. p. 1–4, 2000.

ZERINGUE, H. C., BEEBE, D. J., WHEELER, M. B. Removal of cumulus from mammalian zygotes using microfluidic techniques. **Biomed. Microdevices.** v. 3, p. 219–224, 2001.

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

ZUK, P. A. Stem cell research has only just begun. **Science.** v. 13, p. 211-212, 2001.