



Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático¹

Nuclear transfer: potential applications in the nuclear and cytoplasm genetic control

Flávio Vieira Meirelles², Flávia Devechio Providelo, Felipe Perecin, Giovana Krempel Fonseca Merighe, Christina Ramires Ferreira, José Bento Sterman Ferraz, Joanir Pereira Eler, Moyses dos Santos Miranda, Marcos Roberto Chiaratti, Thiago Henrique Camera De Bem

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil

²Correspondência: meirellf@usp.br

Resumo

A transferência de núcleo de célula somática (clonagem de animal) está sendo explorada comercialmente em muitos países e espécies, e milhares de animais clonados já foram produzidos e entregues aos seus proprietários em todo o mundo. Essa exploração comercial tem contribuído para a evolução da tecnologia, à medida que traz recursos do complexo privado para investir em ciência. No entanto, alguns interesses comerciais dificultam a troca de experiências entre os membros da comunidade científica. Esse artigo pretende discutir o estado da arte da tecnologia, abordar alguns problemas enfrentados em nossa experiência e, finalmente, discutir a possível contribuição da clonagem final, isto é, aquela em que os clones são destinados à produção e não são utilizados como reprodutores, para o ganho genético e para a seleção genética nuclear e citoplasmática nos animais, com ênfase no rebanho bovino. Temas como seleção baseada em características aditivas e não aditivas, bem como seleção ou modificação citoplasmática são discutidos visando suas possíveis aplicações no futuro.

Palavras-chave: clonagem comercial, transferência nuclear, células somáticas, oócito, embrião, mtDNA, bovino.

Abstract

Somatic cell nuclear transfer (animal cloning) is being commercially explored in many countries and species, and thousands of cloned animals have already been produced and delivered to their owners worldwide. The commercial exploration of cloning is contributing to the evolution of the technology, as far as brings funds from de companies to support scientific development, however, other commercial interests challenge the exchange of experiences and knowledge among members of scientific community. This article intends to discuss the state of the art in cloning, to depict some of the problems seen in our experience and, finally, to discuss the possible contribution of terminal cloning, that means the cloning process in which the cloned animals are raised exclusively for production not for reproduction, to the genetic improvement, and nuclei and cytoplasmic genetic selection in animals, with special emphasis in cattle. Selection based in additive and non-additive traits, and cytoplasmic selection or modifications are discussed focusing their possible applications in the future.

Keywords: commercial cloning, nuclei transfer, somatic cells, oocyte, embryo, mtDNA, bovine.

Introdução

Tem-se discutido muito sobre a evolução da transferência de núcleo na última década. A maioria dessas discussões teve início há exatos 10 anos, com a publicação do nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero derivado de transferência de núcleo de célula somática (TNCS; Wilmut *et al.*, 1997). Muitos outros animais *a posteriori* foram produzidos por diversos laboratórios (Latham, 2004). A possibilidade de produzir indivíduos idênticos na pecuária remete ao que observamos na agricultura, onde clones são comuns. Frequentemente, em rodovias, atravessamos florestas imensas de clones de *Eucalyptus sp.* Então porque não usar a clonagem para beneficiar a produção animal?

Desde o final da década de 90, muitos laboratórios vêm aplicando com sucesso a TNCS para produzir clones de diferentes espécies. Alguns relatos mostram um processo caminhando para uma eficiência satisfatória para aplicação no campo, mas na maioria dos casos, os resultados da TNCS são baixos, com taxas variáveis de gestação e viabilidade reduzida dos animais nascidos (Cibelli *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000; Polejaeva *et al.*, 2000; Kasinathan *et al.*, 2001; Keefer *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2003; Woods *et*

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

al., 2003; Meirelles *et al.*, 2006; Panarace *et al.*, 2007). A eficiência do processo, observando-se as taxas de nascimento, fica em torno de 7% para as fêmeas e 12% para os machos. Além disso, há maior mortalidade neonatal entre as fêmeas, o que resulta em aproximadamente o dobro de eficiência da clonagem de machos em relação à clonagem de fêmeas.

As gestações desses animais são problemáticas, com freqüente presença de distúrbios placentários responsáveis por elevadas perdas neste período. O parto e os cuidados neonatais também são, não raramente, frustrantes (Bertolini e Anderson 2002; Batchelder *et al.*, 2007a, b; Miglino *et al.*, 2007; Panarace *et al.*, 2007). Apesar disso, animais clonados estão sendo gerados aos milhares, muitos deles com desenvolvimento aparentemente saudável (Polejaeva *et al.*, 2000; Pace *et al.*, 2002; Heyman, 2005).

Estudos com o objetivo de descobrir o motivo da ineficiência da clonagem assim como melhorar a eficiência da técnica, deverão contribuir para o melhor conhecimento da embriogênese, da biologia celular e dos mecanismos de regulação da expressão gênica (Arnold *et al.*, 2006). Os avanços nessas áreas deverão conseqüentemente melhorar a tecnologia de clonagem (Wrenzycki e Niemann, 2003; Wrenzycki *et al.*, 2004; Lucifero *et al.*, 2006).

A evolução dessa ciência é, todavia, de difícil estimativa e, a qualquer momento, dentro dos próximos dez a vinte anos, podemos estar vivenciando uma explosão da clonagem comercial. Um primeiro sinal deste interesse é a recente divulgação de um relatório pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, afirmando, com base numa série de estudos, que não há risco à saúde humana associado ao consumo de produtos derivados (carne e leite) de clones bovinos, quando comparado à animais não clonados (Takahashi e Ito, 2004; Tomé *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005; Heyman *et al.*, 2007; Rudenko e Matheson, 2007). Estudos na espécie suína têm apontado os mesmos resultados (Walker *et al.*, 2007).

Do ponto de vista genético, um clone é uma cópia genética nuclear. Fatores reprogramadores presentes no citoplasma do oócito, ainda não completamente conhecidos, são capazes de modificar o núcleo somático, tornando-o capaz de garantir o desenvolvimento embrionário e gerar um animal a termo (Campbell *et al.*, 1996; Wimut *et al.*, 1997). Os embriões reconstituídos no processo de clonagem herdaram componentes do oócito receptor que contribuem, de modo majoritário ou total, com a herança citoplasmática, incluindo o DNA mitocondrial (mtDNA) (Steinborn *et al.*, 1998a, b, 2000, 2002; Evans *et al.*, 1999; Hiendler *et al.*, 1999, 2003; Takeda *et al.*, 1999, 2003; Meirelles *et al.*, 2001). Sendo assim, é importante ressaltar que clones são cópias genéticas nucleares, com possíveis variações epigenéticas, citoplasmáticas e fenotípicas (revisado por Smith e Murphy, 2004). Tais variações fenotípicas decorrentes da clonagem podem ser explicadas levando-se em conta os efeitos do ambiente, das linhagens maternas utilizadas como doadores de citoplasma (Bruggerhoff *et al.*, 2002; Tamassia *et al.*, 2003, 2004), e os mecanismos epigenéticos (revisado por Tamada e Kikyo, 2004; Johnson, 2005).

Atualmente, várias empresas já produziram e entregaram animais clonados saudáveis à seus clientes. A iniciativa privada tem produzido, com variável taxa de sucesso, clones de bovinos, ovinos, caprinos, suínos, eqüinos, caninos, felinos, e mesmo de animais silvestres. A crescente necessidade de tornar a clonagem mais eficiente tem estimulado empresas do ramo a alocarem recursos financeiros e mão-de-obra qualificada na busca por aprimoramentos ou inovações no processo de clonagem. Embora se saiba que experimentos científicos importantes e avanços consistentes tenham sido gerados, a difusão desse conhecimento é limitada pelos interesses comerciais e pela competitividade inerente a esse mercado.

Certamente, a bovinocultura responde pela maioria dos clones produzidos comercialmente. É difícil estimar o número total de animais produzidos para fins comerciais; todavia, uma estimativa de 2005 indicava 1500 animais nascidos, no mundo, até então (Heyman, 2005).

No que diz respeito aos animais de produção, os alvos para clonagem são animais superiores para alguma característica fenotípica específica, de alto valor comercial, de alto valor afetivo ou de alto mérito genético. Do ponto de vista de produção animal, o processo de clonagem só é justificado se os animais forem geneticamente superiores em algumas características para as quais foram selecionados (Van Vleck, 1998). Touros com alta diferença esperada de progênie (DEP) e suas mães são bons exemplos de como a clonagem pode acelerar o ganho genético. No entanto, cabe lembrar que no sistema comercial, o proprietário é quem decide o animal a ser clonado nem sempre baseando sua decisão em mérito genético. A título de exemplo, dos clones produzidos no mundo até o momento, cerca de 100 são animais com boa performance em rodeio, e não há evidências de que o comportamento na arena seja mantido nos clones.

A clonagem favoreceu a multiplicação de animais famosos (vivos e mortos), de animais que foram castrados para prática de esportes (especialmente eqüinos) e finalmente de animais com demanda de gametas maior do que a produção.

No Brasil, aproximadamente 28 animais das raças Nelore, Holandesa, Simental e Junqueira, bem como alguns mestiços foram produzidos por TNCS e estão vivos, (11 machos e 17 fêmeas). Esses clones são oriundos de 11 animais (mais de uma cópia por animal clonado) e há ainda outros prestes a nascer. Dentre os clones nacionais, o animal mais velho tem aproximadamente 3,5 anos de idade. Esses dados mostram, por um lado a

competência da pesquisa e da tecnologia nacional, e por outro, uma pequena contribuição para o ganho genético e melhoramento do nosso rebanho (Meirelles *et al.*, 2006).

Finalmente, a aplicação da clonagem está atualmente restrita a rebanhos de elite e a animais com características especiais. De nenhuma maneira a técnica poderia ser aplicada em rebanhos comerciais, salvo se modificações importantes no processo melhorassem a eficiência da técnica. Sendo assim, para a produção animal, a clonagem de reprodutores é, atualmente, sua única aplicação comercialmente viável.

Clonagem de reprodutores

A técnica de clonagem gera uma cópia que pode diferir do animal original (doador de núcleo) essencialmente em dois pontos: i) alterações na cromatina (epigenéticas); e ii) modificações na genética citoplasmática.

O primeiro ponto gera, como revisado (Bertolini *et al.*, 2007), modificações no desenvolvimento embrionário, na placentação, e conseqüentemente, maiores riscos de aborto e dificuldade para a adaptação à vida extra-uterina. Esses problemas podem resultar em variações no desenvolvimento animal, tornando-o não exatamente igual ao do animal original, como esperam seus proprietários. Apesar das alterações epigenéticas poderem estar presentes nos clones, seus descendentes são normais sob todos os aspectos analisados, como na performance produtiva e reprodutiva, em parâmetros bioquímicos e hematológicos, na qualidade e composição de carne e leite, entre outros (Heyman *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2006; Ortegon *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007). Isso indica que a passagem do material genético dos clones pelo seu ciclo germinal é suficiente para corrigir eventuais falhas epigenéticas de modo que os gametas dos clones são geneticamente e epigeneticamente semelhantes aos gametas dos indivíduos originais (Tamashiro *et al.*, 2002; revisado por Wells, 2005).

No que diz respeito à genética citoplasmática, a qual envolve o mtDNA, o modelo zebuino mostrou-se adequado para estudar o mecanismo de herança mitocondrial nos clones (Meirelles *et al.*, 2001). Esse trabalho, juntamente com outros, vem mostrando que clones perdem o mtDNA de origem somática, ou seja, proveniente da célula do animal clonado, para abrigar somente ou majoritariamente, o mtDNA do oócito doador de citoplasma. Essa modificação genética indica que clones não são cópias genéticas exatamente idênticas, e, embora nunca provado, há uma possibilidade de que a substituição do mtDNA tenha efeitos na produção animal.

Dois trabalhos independentes de doutoramento, somando mais de 10.000 animais, estudaram o efeito do mtDNA sobre características produtivas, mostrando ausência de efeito mitocondrial no modelo Nelore (Gunski, 2001; Figueiredo, 2005). Sendo assim, embora a clonagem permita, atualmente não há justificativa para seleção do genoma mitocondrial de um animal, uma vez que não existem provas científicas da importância do mtDNA nas características de produtividade animal de corte.

Finalmente, tendo-se em vista a natureza materna restrita da herança citoplasmática, os machos não contribuem com o mtDNA de seus filhos. Portanto, alterações mitocondriais provenientes da aplicação da clonagem de machos não serão transmitidas à sua progênie.

Clonagem final

Além da clonagem de reprodutores, a TNCS pode vir a contribuir muito com a produção animal se a denominada “clonagem final” se tornar possível. Entende-se por clonagem final aquela em que os clones são destinados diretamente à produção e não são utilizados como reprodutores. De modo análogo, assemelha-se às linhagens comerciais de aves ou suínos, ou nos bovinos de cruzamento industrial, em que os animais são destinados exclusivamente para produção (carne, leite, ovos, etc) sem aproveitamento para reprodução.

Animais clonados gerados diretamente para produção poderiam mudar o paradigma da produção animal, especialmente nas espécies de baixo número de descendentes e intervalo longo entre gerações, como no caso dos bovinos. A transferência de núcleo em larga escala permitiria, nessas espécies, o desenvolvimento de linhagens que, à semelhança de linhagens comerciais de aves e suínos, poderiam trazer homogeneidade genética para o rebanho, multiplicando o melhor animal para um dado manejo. A clonagem final permitiria a multiplicação de indivíduos híbridos, o que levaria, não só a um ganho genético aditivo, isto é aquele decorrente de melhoramento genético quantitativo, mas também à utilização da genética não aditiva, por exemplo proveniente do resultado da heterose, permitindo dessa forma a utilização de efeitos de dominância e epistasia intra e interespecíficas.

A Figura 1 mostra um estudo teórico da aplicação da clonagem final produzido por simulação Monte Carlo. Foram comparados num primeiro estudo, os dados reais de um rebanho Nelore com seleção genética apurada, contra a simulação de um rebanho de animais clonados da raça Nelore. Num segundo estudo, foram comparados os dados reais de um rebanho de animais cruzados (F1 – Nelore x Angus) contra um rebanho (simulado) de animais clonados a partir animais cruzados (F1). Os rebanhos reais (Nelore e F1) foram produzidos mediante inseminação artificial com touro Nelore (Nelore) e Angus (F1) em vacas da raça Nelore. A simulação para os animais clonados foi realizada a partir de clones de um animal com produtividade

imediatamente superior à média, adicionada de 3 desvios (desvio padrão da média) para o peso aos 550 dias (Nelore) e aos 390 dias (F1). Os animais clonados na simulação e no controle (reais) são meio-irmãos, por que têm o mesmo pai, e o software de simulação foi desenvolvido previamente (Meirelles *et al.*, 2004). Para estimar a variabilidade genotípica e fenotípica, admitiu-se uma herdabilidade (h^2) igual a 0,3 e variância não aditiva ($c^2 + i^2$) igual a 5% da variação fenotípica. Dessa maneira, a variável ambiente (incluindo ambiente materno – receptora) foi responsável por 65% de toda a variância fenotípica do modelo.

Os clones mostraram vantagem média de aproximadamente 35% nos animais da raça Nelore (no primeiro estudo) e de 43% nos animais F1 (no segundo estudo), indicando que devido à variância aditiva e não aditiva, o processo de clonagem em animais “híbridos” resultou em um ganho genético mais rápido. No primeiro estudo, esse ganho genético para a característica peso aos 550 dias no Nelore, traduziu-se em média de 120 kg por animal (efeito da genética aditiva), mas com uma distribuição mais homogênea (desvio padrão de 34,15 kg na população concebida, *versus* 31,7 kg na população clonada), devido à ausência da variância genética aditiva. Entretanto, no segundo estudo, envolvendo indivíduos obtidos a partir de animais F1 a clonagem justificou-se mais; gerando uma diferença de peso similar, de cerca de 120 kg, porém em um intervalo de tempo muito mais curto (390 dias de vida em comparação aos 550 dias do Nelore). Esta vantagem do F1 foi gerada pelo efeito genético aditivo, somado ao efeito genético não aditivo, e potencializado pela variabilidade genética do rebanho F1. A variação fenotípica foi largamente diminuída pela fixação da variância genotípica (aditiva e não aditiva; desvio padrão de 41,21 kg na população concebida naturalmente *versus* 30,13 kg na população clonada).

Essa diferença de peso, aliada ao preço da arroba em vigor atualmente (R\$ 57,00 ou US\$ 28,00) poderia justificar um investimento de US\$ 56,00/animal no processo de clonagem do tipo final. Obviamente, esse é um estudo preliminar levando-se em consideração somente o peso. Outras vantagens dos clones, como homogeneidade de sexo, adaptabilidade, padronização, e outras características qualitativas não foram avaliadas. A título de exemplo, para o caso da tecnologia permitir que um mercado especial de exportação fosse atingido, o resultado da clonagem final poderia justificar até US\$ 500,00/animal de investimento.

Sendo assim, a clonagem final tem potencial para melhorar a produção animal, no entanto, tendo-se em vista que o custo é sempre muito próximo ao da receita obtida na agropecuária, o custo-benefício desta tecnologia deve ser avaliado antes da aplicação.

Barreiras para a aplicação da clonagem final

Como mencionado anteriormente, a clonagem comercial está disponível para os criadores. Entretanto, a técnica de clonagem ainda é um procedimento artesanal, com um número muito pequeno de produtos originados ao final de um dia de trabalho (Vajta e Gjerris, 2006). Esse processo moroso aumenta o custo de produção e, portanto, justifica somente a clonagem de animais com alto valor comercial (nem sempre o mais indicado). A automação do processo de clonagem mediante a eliminação da micromanipulação, ou mediante o desenvolvimento de novas estratégias de produção de clones a partir de células-tronco, podem modificar a situação atual e, juntamente com outras modificações, viabilizar a clonagem final.

Taxas de gestação de embriões produzidos por TNCS são baixas em comparação às taxas de gestação de embriões produzidos por fecundação *in vitro* (FIV). Somando-se às baixas taxas de gestação, a TNCS apresenta alta taxa de morte embrionária inicial e tardia, independentemente da espécie (Wells *et al.*, 2004; Bertolini *et al.*, 2007 nesta edição). Bovinos clonados também apresentam alta taxa de mortalidade nos períodos peri-natal e pré-natal, limitando a eficiência da clonagem nesta espécie (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004).

Partos de animais clonados são frequentemente sujeitos à assistência veterinária e os animais originados não raramente apresentam peso acima do normal, com alterações placentárias, aumento da incidência de hidroalantóide, e dificuldade de desencadeamento do parto (Hansen *et al.*, 2005; Miglino, 2004; Miglino *et al.*, 2007). Uma taxa significativa de bezerros morre durante a primeira semana de vida, devido a vários problemas de saúde. As complicações peri-e pós-natais incluem o desenvolvimento de deficiências como a síndrome da membrana hialina, o desenvolvimento anormal dos rins, a dificuldade na regulação da glicemia e a esteatose hepática (Chavatte-Palmer *et al.*, 2004). As perdas pós-natais podem atingir até 30% dos clones que se desenvolvem a termo.

Embora a TNCS produza indivíduos fenotipicamente normais, com frequência resulta em animais com problemas de saúde. Parte dessas alterações é observada imediatamente após o parto, mas alguns estudos têm demonstrado anormalidades manifestando-se na idade adulta, indicando a necessidade de estudos longitudinais em animais clonados. Padrões aberrantes de metilação do DNA e de expressão de genes marcados (*imprinted*) são descritos nos embriões e animais clonados de diferentes espécies (Humpherys *et al.*, 2001; Cezar *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2003). Um exemplo de modificação observado em adultos é a composição corporal de camundongos clonados, a qual demonstra aumento de peso, associado ao aumento do tecido adiposo, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Tamashiro *et al.*, 2002).

O(s) mecanismo(s) responsável(is) pelo desenvolvimento da obesidade nos camundongos clonados ainda não foi(ram) determinado(s). Apesar de não haver descrição de aumento no peso corporal em espécies

domesticadas, exames *postmortem* de fetos bovinos mostraram uma concentração maior de tecido adiposo abdominal, além de níveis plasmáticos elevados de leptina (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002).

Em conjunto, esses problemas levam a uma menor taxa de sucesso na reprodução e, portanto, a um alto custo do procedimento de clonagem. O custo relacionado aos problemas mencionados acima, em conjunto com a incerteza sobre a saúde dos indivíduos, não permite atualmente a aplicação da clonagem final.

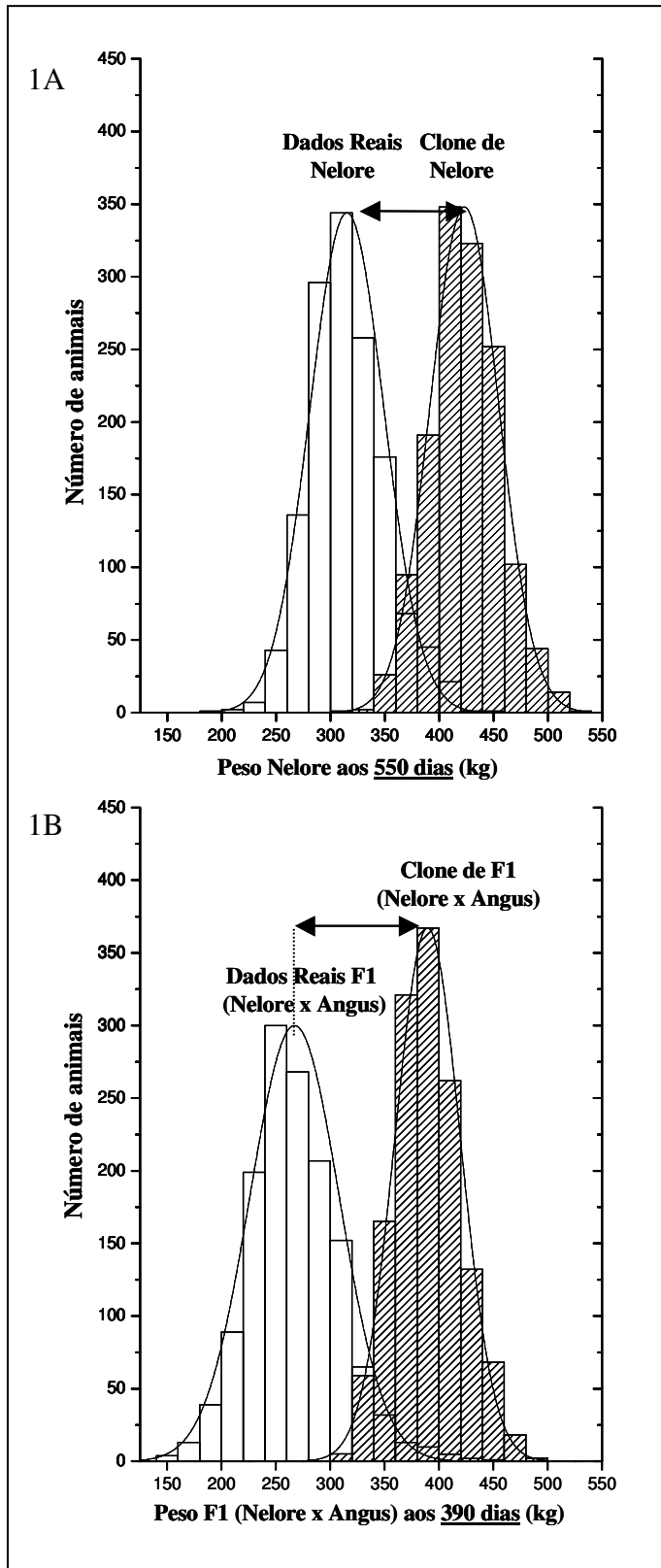


Figura 1. Características de produção (peso aos 550 dias para animais da raça Nelore e peso aos 390 dias para animais F1–Nelore x Angus) em populações reais e populações simuladas de clones mediante aplicação de metodologia de simulação Monte Carlo. (1A) As barras brancas representam a distribuição individual do peso aos 550 dias de uma população Nelore selecionada, gerada por inseminação artificial (IA) de um mesmo touro; as barras hachuradas representam o resultado da simulação Monte Carlo para pesos individuais aos 550 dias de bovinos clonados por TNCS da raça Nelore à partir de um animal real com peso imediatamente superior à média da população real mais três desvios padrão. (1B) As barras brancas representam a distribuição individual do peso aos 390 dias para uma população derivada de IA, de animais filhos de um único touro da raça Red Angus em vacas Nelore. As barras hachuradas representam a distribuição de peso de uma população simulada de clones, com aplicação da mesma seleção descrita para a primeira população. Notar a superioridade de, aproximadamente, 120 kg na média da população clonada em relação aos animais de IA, em ambas as populações. As setas acima dos gráficos mostram o ganho genético gerado pela clonagem. Um ganho genético semelhante ao observado demanda várias gerações de seleção genética em programas de melhoramento convencional. Como esperado, esse ganho é potencializado pela variabilidade genética do rebanho F1.

Observar a distribuição mais homogênea dos clones, com um desvio equivalente a 65% da população de IA, devido à alta herdabilidade da característica de ganho de peso e à ausência de variação genotípica na população.

Conclusões e perspectivas

Como mencionado, a aplicação da clonagem final na produção animal é uma grande oportunidade para o futuro, no entanto, até o momento somente poucos reprodutores foram clonados. Os animais clonados, embora tenham contribuído pouco para o melhoramento genético, favoreceram o estudo de alterações nas gestações e no desenvolvimento, incluindo aspectos da genética citoplasmática, epigenética, placentação, obstetrícia, e na neonatologia de clones. Espera-se que uma contribuição à produção animal ocorra quando a clonagem final em larga escala se tornar possível.

No futuro, a clonagem será certamente acompanhada da produção de animais transgênicos (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003), e proteínas recombinantes (lactoferrina, fator IX, por exemplo) serão produzidas no leite desses animais (Schnieke *et al.*, 1997; Eyestone e Campbell, 1999; Lee *et al.*, 2003), contribuindo para aumentar a produção e diminuir o custo quando comparado a outros métodos de produção/purificação de proteínas (Brink *et al.*, 2000; Fan e Watanabe, 2003; van Arendonk e Bijma, 2003). A modificação dos indivíduos também poderá permitir a produção de animais para xenotransplantes (Eyestone e Campbell, 1999; Phelps *et al.*, 2003).

Sendo assim, no futuro, as biotecnologias da reprodução e do DNA recombinante como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), FIV, TNCS, transgênese, além do melhoramento assistido por marcadores, serão utilizadas em conjunto para produção, seleção e multiplicação de animais mais produtivos. Os animais selecionados serão multiplicados por clonagem final, modificados ou não por recombinação, e depois de avaliados, distribuídos aos produtores. Os últimos poderão produzir animais em sistema de manejo definido, à semelhança de outras criações com linhagens genéticas homogêneas, e vender seus produtos para empresas especializadas de alimento ou da cadeia farmacêutica.

Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio financeiro, e a CAPES e ao CNPq pelo auxílio recebido para manutenção dos bolsistas.

Referências

- Arnold DR, Bordignon V, Lefebvre R, Murphy BD, Smith LC. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*, v.132, p.279-290, 2006.
- Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.83-96, 2007a.
- Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.63-82, 2000b.
- Bertolini M, Anderson GB. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.181-187, 2002.
- Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder CA, Anderson GB. Problemas gestacionais decorrentes das manipulações embrionárias in vitro. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, 2007. No prelo.
- Brink MF, Bishop M.D, Pieper FR. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology*, v.53, p.139-148, 2000.
- Bruggerhoff K, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Prella K, Scherthaner W, Alberio R, Kuchenhoff H, Stojkovic M, Brem G, Hiendleder S, Wolf E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pickup: effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biol Reprod*, v.66, p.367-373, 2002.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, n.6569, p.64-66, 1996.
- Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, v.68, p.1009-1014, 2003.
- Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chiliard Y, Vignon X, Renard JP. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.1596-1603, 2002.
- Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N, Richard C, Issenman H, Laigre P, Heyman Y, Mialot JP. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.94-100, 2004.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, v.16, p.642-646, 1998.

- Evans MJ, Gurer C, Loike JD, Wilmut I, Schnieke AE, Schon EA. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet*, v.23, p.90-93, 1999.
- Eyestone WH, Campbell KH. Nuclear transfer from somatic cells: applications in farm animal species. *J Reprod Fertil Suppl*, n.54, p.489-497, 1999.
- Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther*, v.99, p.261-282, 2003.
- Figueredo, LGG. *Efeito da proporção de DNA de origem Bos taurus em características ligadas à precocidade sexual e de acabamento na raça Nelore*. 2005. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.
- 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.
- Gunski, RJ. *Efeito do DNA mitocondrial sobre características de crescimento da raça Nelore*. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001
- Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v.59, p.33-44, 2003.
- Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinezuk J. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects - a systematic review. *Hum Reprod*, v.20, p.328-338, 2005.
- Heyman Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod Nutr Dev*, v.45, p.353-361, 2005.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Berthelot V, Fromentin G, Hocquette JF, Martignat L, Renard JP. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology*, v.67, p.134-141, 2007.
- Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, Lazzari G, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Galli C. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.111-120, 2004.
- Hiendleder S, Schmutz SM, Erhardt G, Green RD, Plante Y. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol Reprod Dev*, v.54, p.24-31, 1999.
- Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Bruggerhoff K, Prelle K, Brem G, Stojkovic M, Wolf E. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. *Biol Reprod*, v.68, p.159-166, 2003.
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM III, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, v.293, p.95-97, 2001.
- Johnson MH. The problematic in-vitro embryo in the age of epigenetics. *Reprod Biomed Online*, suppl.1, p.88-96, 2005.
- Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside AS, Jerry DJ, Robl JM. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Biol Reprod*, v.64, p.1487-1493, 2001.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v.282, p.2095-2098, 1998.
- Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.199-203, 2002.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.97, p.990-995, 2000.
- Latham KE. Cloning: questions answered and unsolved. *Differentiation*, v.72, p.11-22, 2004.
- Lee JW, Wu SC, Tian XC, Barber M, Hoagland T, Riesen J, Lee KH, Tu CF, Cheng WT, Yang X. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod*, v.69, p.995-1001, 2003.
- Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith LC, Trasler JM. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, v.75, p.531-538, 2006.
- Mann MRW, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, v.69, p.902-914, 2003.
- Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, v.158, p.351-356, 2001.
- Meirelles FDP, Costa EJX, Ferraz JBS. Modelo Computacional de um rebanho virtual utilizando simulação Monte Carlo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2004, Campo Grande, MS. *Anais ... Campo Grande: SBZ*, 2004. p.1-6.

- Meirelles FV, Providelo FD, Merighe GFK, Miranda M, Traldi A, Birgel E, Valim JR, Watanabe YF. Desafios para clonagem commercial – planejando o futuro. *Acta Sci Vet*, v.34, supl.1, p.235-242, 2006.
- Miglino, MA. Clonagem animal e placentação. *Acta Sci Vet*, v.32, p.3-7, 2004.
- Miglino MA, Pereira FTV, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrósio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. Placentation in cloned cattle: structure and, microvascular architecture. *Theriogenology*, 2007. No prelo.
- Ortegon H, Betts DH, Lin L, Coppola G, Perrault SD, Blondin P, King WA. Genomic stability and physiological assessments of live offspring sired by a bull clone, Starbuck II. *Theriogenology*, v.67, p.116-126, 2007.
- Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod*, v.67, p.334-339, 2002.
- Panarace M, Aguero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Jr JC, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*, v.67, p.142-151, 2007.
- Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, Rucker EB, Durtschi D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod*, v.66, p.1001-1005, 2002.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. Production of a 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, v.299, p.411-414, 2003.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v.407, p.86-90, 2000.
- Rudenko L, Matheson JC. The US FDA and animal cloning: risk and regulatory approach. *Theriogenology*, v.67, p.198-206, 2007.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR., Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, v.278, p.2130-2133, 1997.
- Shibata M, Otake M, Tsuchiya S, Chikyu M, Horiuchi A, Kawarasaki T. Reproductive and growth performance in Jin Hua pigs cloned from somatic cell nuclei and the meat quality of their offspring. *J Reprod Dev*, v.52, p.583-590, 2006.
- Smith LC, Murphy BD. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning Stem Cells*, v.6, n.2, p.126-132, 2004.
- Steinborn R, Schinogl P, Wells DN, Bergthaler A, Muller M, Brem G. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, v.162, p.823-829, 2002.
- Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, Achmann R, Scherthaner W, Stojkovic M, Wolf E, Muller M, Brem G. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet*, v.25, p.255-257, 2000.
- Steinborn R, Zakhartchenko V, Jelyazkov J, Klein D, Wolf E, Muller M, Brem G. Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett*, v.426, p.352-356, 1998a.
- Steinborn R, Zakhartchenko V, Wolf E, Muller M, Brem G. Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasm-blastomere fusion. *FEBS Lett*, v.426, p.357-361, 1998b.
- Takahashi S, Ito Y. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.165-171, 2004.
- Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, Kojima T, Takahashi S, Imai H, Yamanaka M, Onishi A, Hanada H. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Mol Reprod Dev*, v.64, p.429-437, 2003.
- Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Goto Y, Miyazawa A, Imai H. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fertil*, v.116, p.253-259, 1999.
- Tamada H, Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet Genome Res*, v.105, p.285-291, 2004.
- Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'alesio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med*, v.8, p.262-267, 2002.



- Tamassia M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard JP, Chastant-Maillard S.** Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. *Reproduction*, v.126, p.629-637, 2003.
- Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpigny G, Stojkovic M, Hiendleder S, Renard JP, Chastant-Maillard S.** In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod*, v.71, p.697-704, 2004.
- Tian XC, Kubota C, Sakashita K, Izaike Y, Okano R, Tabara N, Curchoe C, Jacob L, Zhang Y, Smith S, Bormann C, Xu J, Sato M, Andrew S, Yang X.** Meat and milk composition of bovine clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.102, p.6261-6266, 2005.
- Tomé D, Dubarry M, Fromentin G.** Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.172-177, 2004.
- Vajta G, Gjerris M.** Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim Reprod Sci*, v.92, n.3-4, p.211-230, 2006.
- Van Arendonk JA, Bijma P.** Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe - a modelling approach. *Theriogenology*, v.59, p.635-649, 2003.
- Van Vleck LD.** Implications of cloning for breed improvement strategies. Are traditional methods of animal improvement obsolete? *J Dairy Sci*, v.77, p.111-121, 1998.
- Walker SC, Christenson RK, Ruiz RP, Reeves DE, Pratt SL, Arenivas F, Williams NE, Bruner BL, Polejaeva IA.** Comparison of meat composition from offspring of cloned and conventionally produced boars. *Theriogenology*, v.67, p.178-184, 2007.
- Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B.** The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.101-110, 2004.
- Wells DN.** Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech*, v.24, p.251-264, 2005.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ.** A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v.301, p.1063, 2003.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H.** Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.593-603, 2004.
- Wrenzycki C, Niemann H.** Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reprod Biomed Online*, v.7, p.649-656, 2003.
-