



Produção *in vitro* de embriões e Clonagem: um caminho conhecido?

Embryo in vitro production and cloning: a familiar pathway?

Mara Iolanda Batistella Rubin¹, G.A. Pessoa², D.R. Fraga², F.F. Vasconcelos², C.A.M. Silva¹

¹Embryolab - Laboratório de Embriologia Animal

²Embryolab, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária

Depto de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria

97.105-900 Santa Maria, RS, Brasil

E-mail: mararubin90@yahoo.com.br

Resumo

A produção *in vitro* de embriões é uma técnica que promove o avanço genético e incrementa o potencial reprodutivo com acasalamento de animais superiores. Adicionalmente, é uma alternativa para uso em fêmeas com disfunção reprodutiva e este fato permitiu que a técnica se expandisse da pesquisa para a aplicação comercial. Muitos “enigmas” ainda devem ser desvendados. A ovelha Dolly marcou o início de uma nova era na biotecnologia, levando também a clonagem a evoluir para o nível comercial. Estas biotécnicas, juntamente com a transgenia permitirão o melhoramento genético em menor tempo. O uso da clonagem e da transgenia para o tratamento de doenças humanas continua sendo o próximo grande desafio para o universo científico, político e cultural.

Palavras-chave: clonagem, mamíferos, embriões, reprodução.

Abstract

The in vitro embryo production is one of the techniques that promotes excellence in advanced genetic and enhance reproductive potential of superior breeding animals. Additionally, it is an alternative to overcome reproductive dysfunction in females. This fact is the main reason why the technique quickly expanded from research studies to a commercially scale. Many "mysteries" remain to be revealed. Dolly, the sheep, was the kick-off of a new era in biotechnology, leading to cloning up to the commercial level. These along with the transgenic biotechnology will allow for the genetic improvement in a shorter period of time. The use of cloning and transgenic techniques for the treatment of human diseases is still the next great challenge for the scientific community, under political and cultural guideline.

Keywords: cloning, mammals, embryos, reproduction.

Introdução

Os avanços biotecnológicos que ocorreram nos últimos anos possibilitaram o entendimento do desenvolvimento e da função dos gametas. A fecundação de oócitos maturados *in vivo* foi a base para estudos sobre a fecundação *in vitro* (FIV) e serviu como ferramenta para o tratamento da infertilidade humana (Edwards, 1981). Em vacas suas aplicações clínicas são numerosas, uma vez que fêmeas com obstrução da tuba uterina, aderências do infundíbulo, doenças endometriais, cérvix não funcional e com baixas taxas de fecundação nos programas de transferência de embriões (TE) podem ser aspiradas por via transvaginal com o auxílio da ultrassonografia. A produção *in vitro* de embriões serviu como alicerce para novas biotécnicas como a clonagem e a transgenia.

Nesta revisão será abordado o histórico, o aperfeiçoamento e explorado o futuro da produção *in vitro*, clonagem e transgenia.

Produção *in vitro*

A produção *in vitro* (PIV) expandiu-se nas diferentes espécies animais após o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta (Steptoe e Edwards, 1978). Em 1982 nasceu o primeiro bovino obtido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (Brackett *et al.*, 1982). O procedimento foi realizado através de “laparotomia ventral média”, tanto para coleta dos oócitos quanto para a TE ao oviduto. No ano seguinte, oócitos foram recuperados por laparoscopia (Lambert *et al.*, 1983) após superovulação (SOV) e Sirard *et al* (1985) utilizaram essa técnica, em um mesmo animal, repetidamente, sem lesões permanentes.

Posteriormente, a produção *in vitro* alcançou o sucesso com o nascimento de cordeiros provenientes de

transferência nuclear (Willadsen, 1986), de bezerros obtidos por maturação *in vitro* (MIV) e FIV (Hanada *et al.*, 1986) e gêmeos bovinos por procedimento totalmente *in vitro* (Lu *et al.*, 1988). Em junho de 1990 nasceu o primeiro potro, na França, resultante da única gestação obtida após FIV e TE de oito embriões para a tuba uterina de 8 receptoras (Palmer *et al.*, 1991). O primeiro búfalo de PIV nasceu na Índia (Madan *et al.*, 1991). No mesmo ano, também nasceram cordeiros PIV na Polônia e na Nova Zelândia (Czlonkowska *et al.*, 1991; Pugh *et al.*, 1991). Dois anos após, na França, foi noticiado o nascimento dos primeiros caprinos resultantes da MIV/FIV, cultivados em oviduto de ovelhas (Crozet *et al.*, 1993). Kikuchi *et al.* (2002) anunciaram no Japão os primeiros suínos produzidos totalmente *in vitro*. As pesquisas também permitiram a sobrevivência *in vitro* (Vajta *et al.*, 1997; Vajta e Kuwayama, 2006) e *in vivo* de embriões vitrificados (Berthelot *et al.*, 2002; Cuello *et al.*, 2005) com nascimento de leitegadas sadias.

A expansão da PIV em bovinos tem permitido o uso de grande número de embriões para pesquisa. Esta atividade se expandiu no Brasil com a instalação de várias empresas aplicando a aspiração folicular e produção *in vitro* (OPU-PIV) comercialmente. Entretanto há ainda um hiato no processo que exige o aperfeiçoamento da técnica de criopreservação.

O fato da fêmea *Bos taurus indicus* produzir dezenas de oócitos em um único procedimento de aspiração folicular, numa relação direta com o número de folículos (Pontes *et al.*, 2009), elevou o Brasil à liderança mundial na produção *in vitro* de embriões. Vacas que produzem muitos oócitos tem sido mencionadas na literatura. Seneda¹ da UEL/PR recuperou 251 oócitos de uma vaca Nelore num único procedimento de aspiração folicular. Ainda não existe uma explicação para a diferença na fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*. Dentre as hipóteses, a de que a população de folículos pré-antrais, encontra-se em primeiro plano, por constituir a reserva de gametas femininos a ser utilizada ao longo da vida reprodutiva. No entanto, Silva (2009) verificou similaridade entre a população de folículos pré-antrais de fetos e novilhas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* e variação individual significativa na quantidade dos folículos das duas categorias estudadas.

A evolução da pesquisa biotecnológica passou pela polêmica proposta por pesquisadores quanto ao conceito de estoque limitado dos gametas femininos em mamíferos. Em 2004, Clark *et al.* enfatizaram que a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em corpos embrionários *in vitro* resulta na formação de células que expressam marcadores específicos para gonócitos. Existem indícios consolidados que contrariam o paradigma básico da fisiologia reprodutiva, de que a produção de células germinativas e oócitos é exclusiva da fase fetal. A pesquisa de Johnson *et al.* (2004) causou grande impacto na comunidade científica ao notificar a renovação folicular em camundongas jovens e adultas. Este estudo foi contestado por Byskov *et al.* (2005). Posteriormente, Johnson *et al.* (2005) afirmaram que as células-tronco da medula óssea são responsáveis pela renovação dos gametas femininos. Nesta mesma direção, Li *et al.* (2005) documentaram a indução *in vitro* da diferenciação de células-tronco da epiderme fetal em células germinativas e oócitos. Essas descobertas exigiram investigações contínuas para a sedimentação de novos conceitos, visto que o paradigma carece de consenso, desde o período de crescimento folicular até a ausência de funcionalidade dos oócitos (Gosden, 2004, Byskov *et al.*, 2005).

No processo de seleção genética baseado na identificação de variantes alélicas de genes específicos, os embriões produzidos *in vitro* podem ser utilizados antes mesmo do estabelecimento da gestação. As taxas de seleção das características quantitativas podem ser melhoradas pela PIV quando a mesma aumenta a eficiência e a intensidade da seleção, reduzindo o intervalo entre gerações. Os programas de cruzamento têm despertado a atenção para aplicação nos sistemas de produção leiteira, com a transferência de embriões PIV resultantes de F1 para fêmeas F1, como estratégia para eliminar a perda da heterose e aumentar a variação fenotípica, decorrente de fêmeas F1 acasaladas com touros puros ou cruzados (Hansen, 2006).

Os protocolos para a MIV, FIV e CIV tem sido modificados constantemente através das pesquisas conduzidas nas instituições públicas ou na iniciativa privada, em busca de blastocistos viáveis para transferência (Gordon 2003), ou congelamento para transferência direta (Saliba, 2009; Cenatte Embriões/MG; Comunicação pessoal). A albumina sérica bovina (BSA), o soro fetal bovino (SFB), o soro de vaca em estro, o soro de égua em estro e o co-cultivo celular ainda hoje são utilizados para a produção *in vitro* de embriões. Procedimentos de cultivo embrionário livres de soro ou em que o soro é introduzido somente em fases mais adiantadas do procedimento foram introduzidos na rotina da PIV comercial (Leivas, 2006). Farin *et al.* (2006) e Miglino (2007) descreveram as modificações observadas nas variações morfológicas fetais e placentárias, no metabolismo embrionário e na expressão gênica dos bezerros recém-nascidos como consequência do uso destes sistemas de produção.

Deve-se ter sempre em mente, mesmo quando se trabalha com controle de qualidade, o potencial do risco de transmissão de doenças na produção de embriões, tanto na pesquisa como na produção comercial. Revisando o potencial de transmissão vírica através de embriões PIV, Wrathall *et al.* (2006) consideram que o risco é baixo, mas não completamente compreendido. Bielanski *et al.* (2003) e Bielanski (2005) verificaram a contaminação microbiana no sêmen e embriões criopreservados por longo período em botijões de nitrogênio líquido e a eficiência da descontaminação dos mesmos. A metodologia de prevenção para eliminação destes riscos ainda não está estabelecida. No Brasil, a atenção foi enfocada nesta direção examinando os botijões de

nitrogênio líquido utilizados para armazenamento de sêmen e embriões quanto ao grau de contaminação bacteriológica antes e após a desinfecção (Rubin *et al.*, 2005).

A expansão da PIV em bovinos se deu pela facilidade de obtenção de elevado número de oócitos, especialmente através da aspiração folicular. Ainda se pode antever um futuro otimista, para esta técnica, sobretudo em países de características tropicais, ainda em desenvolvimento, não somente em biotecnologia, mas econômico e social. Neste contexto, a comunidade científica participa ativamente na evolução e difusão da aplicação das biotécnicas disponíveis.

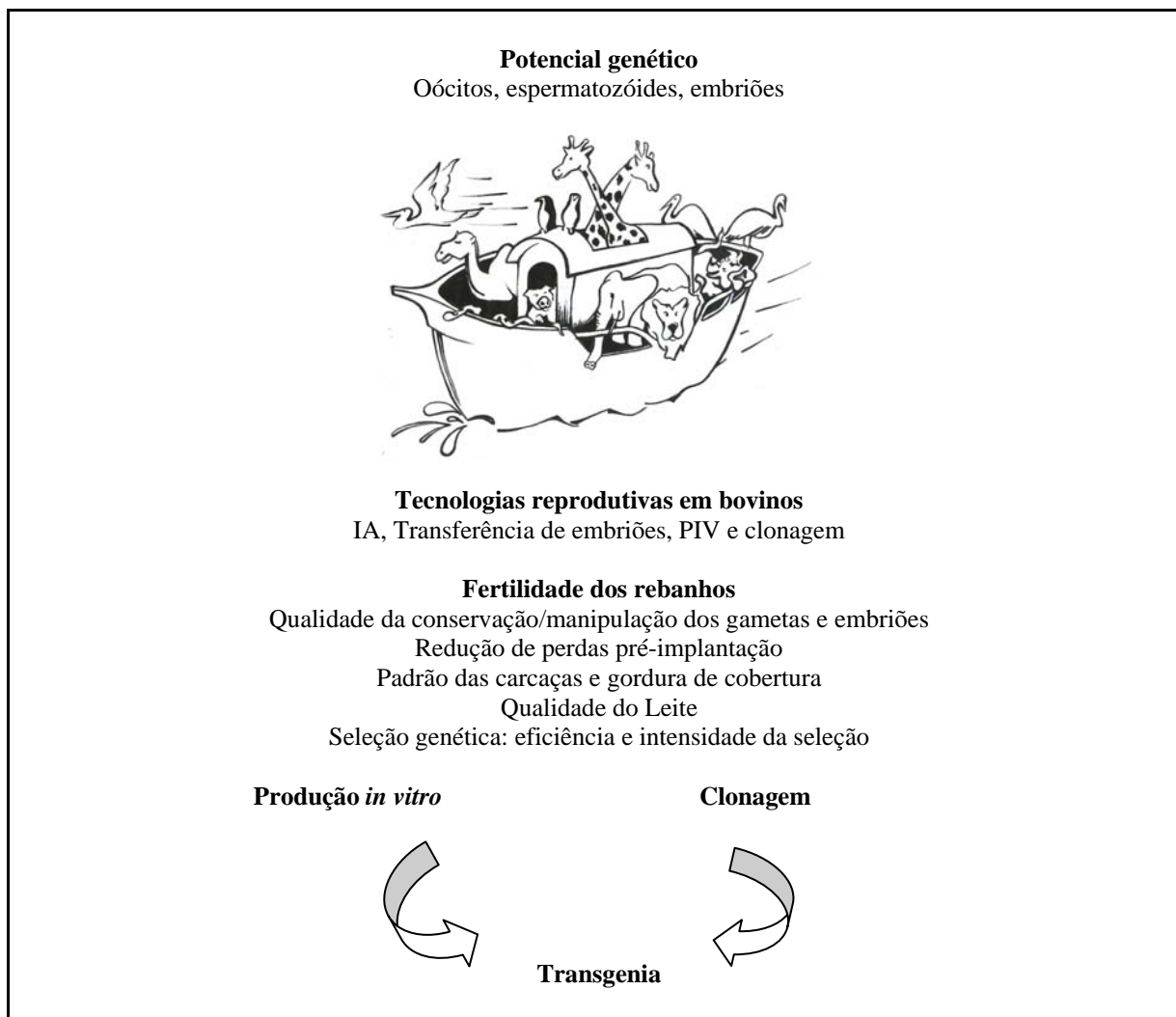


Figura 1. Descrição esquemática das possibilidades de uso do potencial genético animal.

Clonagem

Existe um consenso na comunidade científica que a clonagem por transferência nuclear trouxe perspectivas promissoras de reprogramar núcleos de células adultas buscando diretamente um estágio pluripotencial (Campbell *et al.*, 1996). Em 1997, com o anúncio do nascimento da Dolly (Wilmut *et al.*, 1997), a clonagem derrubou o dogma da biologia, pois, até então, células não-germinativas de mamíferos eram incapazes de gerar um novo ser. Posteriormente, também foram clonados camundongos (Wakayama *et al.*, 1998), bovinos (Kato *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999), suínos (Baguisi *et al.*, 1999; Onishi *et al.*, 2000), coelhos (Chesne *et al.*, 2002), gatos (Shin *et al.*, 2002), mulas (Woods *et al.*, 2003), eqüinos (Galli *et al.*, 2003, Vanderwall *et al.*, 2004; Hinrichs, 2005), cães (Lee *et al.*, 2005) e dromedários (Wani, 2009).

A clonagem pode ser obtida através da **divisão nuclear cirúrgica** utilizando-se embriões no estágio de mórula e blastocisto, o que já permitiu a criação de 2, e raramente 4, indivíduos idênticos (Robl e First, 1985); esses resultados, na atualidade, situam a técnica como de baixa eficiência para aplicação com o objetivo de se alcançar um amplo nível de homogeneidade para características desejadas numa determinada população.

Mas, durante décadas, um dos grandes sonhos dos produtores foi o de clonar animais de destacado valor genético. Parte desta conquista foi obtida com a primeira divisão de embriões bovinos que resultou em gêmeos monozigotos (Willadensen *et al.*, 1979; Nowshari e Holtz, 1993). No entanto, por limitações técnicas, não se

podia produzir muitos animais da mesma origem (Stice e Keefer, 1993). O uso restrito da divisão de embriões pode ser atribuído ao tempo de manipulação requerido para conduzir o procedimento e a habilidade do profissional em executar o processo. Lange (1995) obteve 40% de prenhez com embriões divididos, no entanto, este índice é inferior ao alcançado com embriões frescos e inteiros (60%); hemi-embriões congelados produzem a metade das taxas de prenhez obtidas com embriões inteiros; o produtor por questões comerciais não possui interesse em dividir os embriões sem previamente conhecer o sexo. Sexar e dividir embriões significam aumento na perda de blastômeros e, conseqüentemente, na possibilidade de redução do índice de prenhez.

A produção de **quimeras idênticas** também é uma clonagem e consiste na substituição de blastômeros de embriões em estágios avançados de desenvolvimento por blastômeros mais jovens. Esta técnica, utilizada com o objetivo de estimular o desenvolvimento de embriões, caiu em desuso.

A clonagem de embriões de mamíferos utilizando-se **células embrionárias de mórulas** ou **estágios pré-cavitários**, definidos como doadores de núcleo e oócitos receptores, antecedeu a técnica que revolucionou os conceitos já existentes sobre a diferenciação celular.

A clonagem através da **transferência nuclear com células somáticas** é a técnica que viabilizou o nascimento de Dolly (a partir de uma célula adulta) e também foi a responsável pela descoberta de que uma célula em fase de inatividade celular ou ausência de divisão, conhecida como GO, independentemente de seu estado de diferenciação, pode retornar ao seu estágio totipotente e gerar um novo indivíduo. Esta descoberta gerou as ovelhas Megan e Morag, produtos de clonagem com células embrionárias (Campbell, 1996).

Graças ao desenvolvimento da clonagem, juntamente com modificações do genoma (transgenia), aprofundaram-se as pesquisas com animais de produção transgênicos destinados a modelos de estudos, produção animal e tratamento de enfermidades que ocorrem no homem (Cammuso *et al.*, 2000; Maga, 2001). No Brasil, a Embrapa-Cenargen de Brasília/DF foi a pioneira na clonagem bovina com o nascimento da bezerra Vitória, em março de 2001 (Rumpf *et al.* 2001). Ao contrário da ovelha Dolly, Vitória não apresentou envelhecimento precoce e deu a luz em 2004 à bezerra “Glória”, e em 2006 ao bezerro “Galante”, ambos gerados por inseminação artificial.

As alterações que impedem o desenvolvimento fetal e causam envelhecimento precoce após o nascimento foi identificada em clones (Wells *et al.*, 2004) e caracterizada como ‘Síndrome do clone’. Kohan-Ghadr *et al.* (2008) identificou por ultrassonografia e por observações histológicas as alterações placentárias que comprometem o desenvolvimento fetal. No entanto, em progêneses de clones não foram observadas alterações genéticas e fisiológicas (Ortegon *et al.*, 2007). Os fatores envolvidos no desenvolvimento fetal de clones foram foco de um estudo desenvolvido na USP/SP por Miglino (2004), que atribui as principais falhas a alterações na vasculogênese e angiogênese elevando a mortalidade de embriões clones. Naquele ano, a taxa de nascimento dos clones no Brasil foi de 12% para machos e 7% para fêmeas (Meirelles *et al.*, 2004). Em 2004, a clonagem comercial já estava disponível aos produtores no Brasil e alguns reprodutores já haviam sido clonados. Para Wells *et al.* (1999) e Meirelles (2004) a taxa de apenas 6% de sobrevivência a termo poderia ser um fator limitante para expansão comercial da clonagem, incluindo o alto custo.

A evolução da clonagem na América do Sul pode ser exemplificada pelo estudo conduzido na Argentina, Brasil e Estados Unidos com 2.466 receptoras que resultaram em 41% de prenhez aos 30 dias e 11% de nascimentos. Destes, 9% nasceram vivos e 8% sobreviveram 24h após o parto. A sobrevivência após 150 dias foi de 7%. Neste estudo, a equipe brasileira obteve 43% (n = 89) de prenhez aos 30 dias; taxa de nascimento de 22% e 20% de bezerros vivos. A sobrevivência após 24h e 150 dias após nascimento foi de 19% e 15%, respectivamente (Panarace *et al.*, 2007).

Em março de 2009, a Cabanha da Maya de Bagé/RS foi referida pela revista Balde Branco com a divulgação da reportagem “Clonagem já é prática na fazenda” noticiando o nascimento de duas bezerras produzidas pelas empresas *In vitro* e Cyagra Brasil, também responsáveis pelos cinco clones do reprodutor “Bandido”. As bezerras clonadas originaram-se da produção de uma linhagem celular da fêmea “Responses Wonder” da raça Jersey, campeã da raça nos Estados Unidos e importada há alguns anos. A convalescência da matriz, morta em janeiro/2007, e o sucesso alcançado com o nascimento de suas filhas, nos remetem a perspectivas positivas para a produção de animais com genética superior, cuja demanda é mais ampla do que o que se tem disponível. Meirelles *et al.* (2004) já anteviam uma contribuição maior da técnica à produção animal quando, finalmente, a clonagem em larga escala estivesse disponível, especialmente quando aliada a produção de animais transgênicos visando a produção de proteínas recombinantes para o consumo humano.

É indiscutível a expansão das atividades em biotecnologia nos países em desenvolvimento. No Brasil, inúmeros projetos estão em andamento. Os países mais pobres se vêem obrigados a desenvolver e utilizar a biotecnologia, por exemplo para tentar diminuir o custo da alimentação de suas populações para se tornar independentes em alguns setores da produção de alimentos. Se este processo de especialização requer décadas para a preparação do futuro, por outro lado, o índice de crescimento da população aumenta exponencialmente, gerando grande expectativa para a solução do problema.

O relatório sobre a situação da população mundial de 2008, divulgado em 12/11/2008 pelo Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA), estimou em 6,75 bilhões de pessoas a população do planeta. Destes, 4 bilhões concentram-se na Ásia. Até 2050, a população mundial deverá crescer para 9,2 bilhões de habitantes. Na

África, a população deverá duplicar, dos atuais 1 bilhão para 2 bilhões de pessoas. A taxa de fertilidade no continente africano é de 4,6 filhos por mulher, enquanto na Europa esta taxa é de 1,45 filhos por mulher. O Brasil, que é o país mais populoso da comunidade de língua portuguesa, passará dos atuais 194,2 milhões de habitantes para 254,1 milhões.

A agricultura na Ásia ilustra a importância da biotecnologia para o Terceiro Mundo. No início da década de 90, contava com mais de 50% da população mundial, mais de 70% das famílias agricultoras do mundo e apenas 25% das terras aráveis do planeta. Antevia-se que no início do século XXI, a disponibilidade de terra *per capita* seria de 0,1 hectares na China e 0,14 hectares na Índia. O índice de crescimento da população na Ásia era de 1,86% no início da década de 90. A estratégia utilizada pela China e Índia para alimentar sua população crescente fundamentou-se no planejamento e aplicação contínua de melhoria dos rendimentos. Com essa finalidade, a China dedicou-se, nas últimas duas décadas, à exploração em grande escala dos híbridos do arroz e a biotecnologia contribuiu para aumentar a produtividade dos produtos cultiváveis.

Como exemplo da evolução biotecnológica pode-se citar a Genzyme Europe B.V. que em 2006 lançou uma anti-trombina recombinante humana (ATryn®) produzida por cabras transgênicas que passavam a sintetizá-la e liberá-la no leite. A ATryn® foi então o primeiro medicamento recombinante no mercado internacional cuja produção não foi através de bactérias ou por cultivo celular (Palma, 2008) e com custo mais acessível. Pesquisadores de áreas afins investiram tempo e desenvolveram novos conhecimentos. As linhas de pesquisas voltaram-se para a indução das células-tronco pluripotentes resultando numa evolução notável e competitiva num período inferior a três anos (Tab. 1).

Tabela 1. Evolução das pesquisas com clonagem de células-tronco pluripotentes induzidas

	Descoberta	Autoria
Agosto/2006	<ul style="list-style-type: none"> Com quatro genes foi possível produzir o primeiro camundongo a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) 	Takahashi e Yamanaka, 2006
Junho/2007	<ul style="list-style-type: none"> Células-tronco pluripotentes induzidas podem gerar todos tipos de células 	Okita <i>et al.</i> , 2007 Wernig <i>et al.</i> , 2007 Maherali <i>et al.</i> , 2007
Novembro- Dezembro/2007	<ul style="list-style-type: none"> As células humanas são induzidas à pluripotencialidade O oncogene <i>c-Myc</i> não é requisito para reprogramação celular iPS curam camundongos com anemia falciforme 	Yu <i>et al.</i> , 2007 Takahashi <i>et al.</i> , 2007 Park <i>et al.</i> , 2008 Wernig <i>et al.</i> , 2008 Nakagawa <i>et al.</i> , 2008 Hanna <i>et al.</i> , 2007
Agosto/2008	<ul style="list-style-type: none"> iPS são produzidas de pacientes com doenças múltiplas 	Park <i>et al.</i> 2008 Dimos <i>et al.</i> , 2008
Setembro- Outubro/2008	<ul style="list-style-type: none"> iPS de camundongos são reprogramadas sem integração de DNA detectável 	Stadtfeld <i>et al.</i> , 2008 Okita <i>et al.</i> , 2008
Dezembro/2008	<ul style="list-style-type: none"> Células-tronco pluripotentes induzidas de pacientes com doença neurodegenerativa sugerem que é possível simular a doença <i>in vitro</i> 	Ebert <i>et al.</i> 2009
Março/2009	<ul style="list-style-type: none"> Cientistas reprogramam genes a partir de células-tronco pluripotentes induzidas iPS humanas são reprogramadas sem integração genética 	Woltjen <i>et al.</i> , 2009 Kaji <i>et al.</i> , 2009 Soldner <i>et al.</i> , 2009 Yu <i>et al.</i> , 2009

O jornal “The Washington Post” publicou em janeiro de 2008 o artigo “Clonagem animal: um acesso de risco” enfatizando o consumo de alimentos provenientes de clones bovinos, ovinos e caprinos, de suas progênes, bem como estudos focados na composição do leite de animais clonados destinados ao consumo humano. Por outro lado, a Food and Drugs Administration (FDA), entidade responsável pelo controle de produção, qualidade,

venda de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos liberou, também em 2008, os produtos (carne e leite) de clones e de seus descendentes para consumo humano, sob o argumento de que a clonagem não produz alteração, adição ou mudança no DNA como provoca a engenharia genética.

A possibilidade de obter células pluripotentes de específicos pacientes vislumbra novas perspectivas de estudo de doenças hereditárias quando a causa da mutação é desconhecida. Este é o foco de uma das pesquisas coordenadas pelo Dr. Ian Wilmut, na Inglaterra.

A clonagem nuclear e a transgênese são tecnologias genéticas que ainda necessitam investimento científico e resoluções legislativas. As técnicas de produção *in vitro* de embriões integram os procedimentos de clonagem, que por sua vez são fundamentais para a produção de bovinos transgênicos. Será imprescindível que a sociedade alcance consenso científico, político e social, para a aplicação da clonagem e da transgenia, na produção de medicamento para a cura de doenças humanas, e que as utilize de forma ética.

Na produção animal, num futuro promissor, estas técnicas poderão ser aplicadas em larga escala para se produzir com maior eficiência. A aplicação dessas biotecnologias na produção de alimentos em larga escala com menor gasto energético, especialmente na produção animal, deverá crescer e representará uma necessidade para os países produtores e com foco na redução ambiental, entre eles, e cada vez mais, o Brasil, que já possui o maior rebanho bovino comercial do mundo.

Referências

- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999.
- Berthelot F, Locatelli A, Venturi E, Martinat-Botte F.** *In vitro* and *in vivo* development of zona pelucida-intact morula stage porcine embryos with OPS method and an appropriate concentration of cryoprotectants. In: Meeting European Embryo Transfer Association, 18, 2002, Rolduc. *Proceedings ... Rolduc: EETS 2002*. p.140.
- Bielanski A.** Disinfection of dry (vapor) shippers ("dewars") from microbial contamination associated with cryopreserved germplasm. *Reprod Fertil Dev*, v.17, p.241-242, 2005.
- Bielanski A, Begeron H, Lau PC, Venish J.** Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, v.46, p.146-152, 2003.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA.** Normal development following *in-vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, v.27, p.147-158, 1982.
- Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY.** Eggs forever? *Differentiation*, v.73, p.438-446, 2005.
- Cammuso C, Porter C, Nims S, Gaucher D, Melican D, Bombard S, Hawkins N, O'coin A, Ricci C, Brayon C, Buzzel N, Ziomek C, Gavin W.** Hormonal induced lactation in transgenic goats. *Anim Biotechnol*, v.11, p.1-17, 2000.
- Campbell KH, Mcwhir J, Ritchie WA, Wilmut I.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, p.64-66, 1996.
- Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP.** Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, v.20, p.366-369, 2002.
- Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA.** Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet*, v.13, p.727-739, 2004.
- Crozet N, De Smedt V, Ahmed-Ali M, Sevellec C.** Normal development following *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology*, v.39, p.206, 1993. (Abstract).
- Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botte F, Venturi E, Guillouet P, Vazquez Jm, Roca J, Martinez EA.** Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim Reprod Sci*, v.85, p.275-286, 2005.
- Czlonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski M, Dziak, J.** Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. *Mol Reprod Dev*, v.30, p.34-38, 1991.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K.** Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, v.321, p.1218-1221, 2008.
- Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN.** Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, v.457, p.277-280, 2009.
- Edwards RG.** Test-tube babies. *Nature*, v.293, p.253, 1981.
- Farin PW, Piedrahita JA, Charlotte EF.** Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.65, p.178-191, 2006.
- 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.
- Gordon I.** *Laboratory production of cattle embryos*. 2.ed. Cambridge:University Press, 2003. 548p.
- Gosden RG.** Germ line stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Hum Reprod Update*,

v.10, p.193-195, 2004.

Hanada A, Enya Y, Susuki T. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Japan J Anim Reprod*, v.32, p.208, 1986. (Abstract).

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, v.318, p.1920-1923, 2007.

Hansen PJ. Realizing the promise of IVF in cattle: an overview. *Theriogenology*, v.65, p.119-125, 2006.

Hinrichs K. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology*, v.64, p.535-41, 2005.

Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Nikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes MI, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JI. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v.122, p.303-315, 2005.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JI. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v.428, p.145-150, 2004.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, v.458, p.771-775, 2009.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eighth calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v.282, p.2095-8, 1998.

Kikuchi K, Onishi A, Kaskiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol Reprod*, v.66, p.1033-1041, 2002.

Kohan-Ghadr HR, Lefebvre RC, Fecteau G, Smith LC, Murphy BD, Suzuki Jr. J, Girard C, Hélie P. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Theriogenology*, v.69, p.218-230, 2008.

Lange H. Cryopreservation of bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. *Theriogenology*, v.43, p.258, 1995.

Lambert RD, Bernard C, Rioux JE, Beland R, Dàmours D, Montreuil A. Endoscopy in cattle by the paralombar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, v.20, p.149-161, 1983.

Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, v.436, p.641, 2005.

Leivas, FG. *Sistemas de produção in vitro de embriões bovinos: Influência da atmosfera gasosa e da fonte protéica sobre o desenvolvimento embrionário e a taxa de prenhez.* 2006. 59p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

Li J, Dyce P, Wen L. Germ line potential of stem cells derived from porcine skin. *Biol Reprod Spec Issue*, p.97-98, 2005.

Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, Mcgovern H. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet Rec*, v.122, p.539-540, 1988.

Madan MI, Singla SK, Jaikhani S, Ambrose JD. *In vitro* fertilization and birth of first ever IVF buffalo calf. In: World Buffalo Congress, 3, 1991, Varna, Bulgaria. *Proceedings ... Varna: WBC, 1991.* v.7, p.11-17.

Maga EA. The use of recombinase proteins to generate transgenic large animals. *Cloning Stem Cells*, v.3, p.233-241, 2001.

Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, v.1, p.55-70, 2007.

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.

Miglino MA. Clonagem animal e placentação. *Acta Sci Vet*, v.32, supl., p.75-78, 2004.

Miglino, MA, Pereira FTV, Visintin J, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrozio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*, v.68, p.604-617, 2007.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, v.26, p.101-106, 2008

Nowshari MA, Holtz W. Transfer of split goat embryos without zona pellucida either fresh or after freezing. *J Anim Sci*, v.71, p.3403-3408, 1993.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, v.448, p.313-317, 2007.

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, v.322, p.949-953, 2008.

Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by



- microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, v.289, p.1188-1190, 2000.
- 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.
- Palma GA.** Biotecnología de la reproducción ciencia, tecnología y sociedad. In: Palma GA. *Biotecnología de la reproducción*. 2.ed. Mar del Plata: Reprobioec, 2008. p.1-32.
- Palmer E, Bezar J, Magistrini M, Duchamp G.** *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil*, v.44, p.375-384, 1991.
- Panarace M, Agüero 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 IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ.** Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, v.134, p.877-886, 2008.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ.** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, v.451, p.141-146, 2008.
- Pontes J, Nonato-Junior I, Sanches B, Ereno-Junior J, Uvo S, Barreiros T, Oliveira J, Hasler J, Seneda M.** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- Pugh PA, Fukui Y, Tervit HR, Thompson JG.** Developmental ability of *in vitro* matured sheep oocytes collected during the non-breeding season and fertilized *in vitro* with frozen ram semen. *Theriogenology*, v.36, p.771-778, 1991.
- Robl JM, First NL.** Manipulation of gamete and embryos in the pig. *J Reprod Fertil Suppl*, n.33, p.101-114, 1985.
- Rubin MIB, Silva CAM, Oliveira RA, Pessoa GA, Navarro RB, Pretto AN, Vargas AC.** Contaminação bacteriana em botijões de nitrogênio líquido. *Acta Sci Vet*, v.33, supl., p.406, 2005.
- Rumpf R, Iguma L.T, Sousa RV de.** Produção de clones pela transferência nuclear em bovinos. *Revista CFMV Brasília – DF.* Ano VII. n. 22, p.16-24, 2001.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M.** A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, v.415, p.859, 2002.
- Silva KCF.** *Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas Bos taurus taurus e Bos taurus indicus.* 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.
- Sirard MA, Lambert RD, Beland R, Bernard C.** The effect of repeated laparoscopic surgery used for ovarian examination in the cow. *Anim Reprod Sci*, v.9, p.25-30, 1985.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R.** Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, v.136, p.964-977, 2009.
- Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K.** Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, v.322, p.945-949, 2008.
- Steptoe PC, Edwards RG.** Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, v.2, p.366, 1978.
- Stice SL, Keefer CL.** Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod*, v.48, p.715-719, 1993.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v.131, p.861-872, 2007.
- Takahashi K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v.126, p.663-676, 2006.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H.** Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw(OPS) method. *Acta Vet Scand*, v.38, p.349-352, 1997.
- Vajta G, Kuwayama M.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v.65, p.236-244, 2006.
- Vanderwall DK, Woods GL, Aston KI, Bunch TD, Li G, Meerdo LN, White KL.** Cloned horse pregnancies produced using adult cumulus cells. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.675-679, 2004.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, v.394, p.369-374, 1998.
- Wani, N.A.** Scientist: First Cloned Camel Born in Dubai. Disponível em: <http://abcnews.go.com/Technology/Science/wireStory?id=7333226>. Acesso em 20.abr.2009.
- Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B.** The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.101-10, 2004.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR.** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, v.60, p.996-1005, 1999.
- Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R.** c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, v.2, p.10-12, 2008.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R.** In



in vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, v.448, p.318-324, 2007.

Willadsen SM. Cloning os sheep and cow embryos. *Genome*, v.31, p.956-962, 1979.

Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-66, 1986.

Wilmot I, Schinieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbel KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, v.458, p.766-770, 2009.

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.

Wrathall AE, Simons HA, Van Soom A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology*, v.65, p.247-274, 2006.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, advance online publication doi:10.1126/science.1172482 (26 Mar 2009).

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, v.318, p.1917-1920, 2007.
