

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CLONAGEM ANIMAL

Autora: Verônica Rafaela Benvenuti

**Porto Alegre
2020/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CLONAGEM ANIMAL

Autora: Verônica Rafaela Benvenuto

**Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Dr. José Luiz Rigo Rodrigues
Coorientador: Dr. Marcelo Bertolini**

Porto Alegre

2020/2

CIP - Catalogação na Publicação

Benvenutti, Verônica Rafaela
Clonagem Animal / Verônica Rafaela Benvenutti. --
2020/2.
69 f.
Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Coorientador: Marcelo Bertolini.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto
Alegre, BR-RS, 2020/2.

1. Clonagem animal. 2. Reprodução animal. 3.
Biotécnica da reprodução. I. Rodrigues, José Luiz Rigo,
orient. II. Bertolini, Marcelo, coorient. III.
Título.

Verônica Rafaela Benvenuti

CLONAGEM ANIMAL

Aprovado em: 12 de maio de 2021 .

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. João Batista Borges
Membro da Comissão

MSc. Higor da Silva Ferreira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, que foi essencial para minha formação, sempre me apoiando nas decisões tomadas e me incentivando a buscar o que eu sempre almejei. Obrigada aos meus pais Vera Lucia e João Carlos, por terem sido exemplos de força e superação, por terem proporcionado a mim e aos meus irmãos, João Afonso e Bernardo Luiz, um lar cheio de amor e união, e por sempre valorizarem nossa educação acima de tudo. Mesmo de longe eu sentia o amor de vocês, obrigada por acreditarem em mim.

Agradeço também à equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução FAVET/UFRGS que me ensinou muito ao longo dos últimos quatro anos, sendo esta uma experiência singular e que com certeza colaborou muito para minha formação. Agradeço em especial, aos Professores José Luiz Rigo Rodrigues e Marcelo Bertolini pela orientação que recebi durante esse período, sendo eles exemplos de educadores e pessoas que admiro muito.

Ao longo dos anos de graduação, conheci muitas pessoas que não só agregaram na minha formação acadêmica como também se tornaram amigas que levarei para o resto da vida. Agradeço em especial às minhas amigas que estão comigo desde o primeiro semestre: Alanna, Camila, Ketlyn, Mariáh, Mayara, Natália e Nina. Sem vocês, a graduação não teria sido a mesma, obrigada por enfrentarem essa jornada comigo.

RESUMO

A clonagem animal é uma biotécnica reprodutiva na qual se produz um animal geneticamente idêntico a outro, a partir da utilização de células como provedoras de material genético do organismo a ser clonado. A técnica mais utilizada na realização da clonagem é a transferência nuclear de célula somática (TNCS), a qual pode ser feita a partir de células de origens variadas, incluindo embriões, fetos e animais adultos. A clonagem por TNCS é uma técnica complexa e necessita de muita cautela durante a execução das diferentes etapas, podendo ser realizada com o auxílio de micromanipulação ou conduzida de forma manual (*Handmade Cloning*), exigindo material biológico e equipamentos específicos, para ser conduzida com sucesso. Apesar dos avanços que a clonagem animal vem conquistando ao longo do tempo, sua eficiência ainda é baixa, sendo reduzido o número de animais que chegam a termo e sobrevivem após o nascimento. Isso se deve, provavelmente, a falhas de reprogramação epigenética que os embriões sofrem após sua reconstrução. Os problemas observados podem ser variados, sendo expressos como: perdas gestacionais, desenvolvimento fetal anormal, crescimento exagerado ou ainda como sequelas em diferentes sistemas corporais, observadas na vida pós-natal. A clonagem é utilizada principalmente na Medicina Veterinária, seja para aplicação em animais de produção, de estimação ou ainda nas espécies ameaçadas de extinção. Além dessas, ainda existem aplicações biomédicas que visam a utilização de animais geneticamente modificados para aspectos relacionados à produção animal e meio ambiente, à produção de proteínas recombinantes para uso humano, terapias celulares ou ainda como modelos para pesquisa de doenças e como provedores de órgãos e tecidos para xenotransplantes. Um dos problemas que pode ser observado em animais submetidos à clonagem, ou envolvidos no processo (como as fêmeas receptoras), é o nível de bem-estar animal, principalmente em relação à dor e ao sofrimento aos quais esses animais podem estar sendo submetidos. A técnica ainda apresenta questões éticas e morais, principalmente quando se considera sua possível aplicação em humanos, ou quando se cogita o consumo de alimentos originados de animais geneticamente modificados. O médico veterinário se insere nesse meio como uma peça fundamental para auxiliar no entendimento da ciência e na biologia que envolve a clonagem animal. Esta revisão de literatura teve como objetivo esclarecer diferentes aspectos da clonagem animal, destacando a história, a fisiologia e os cenários sociais da sua aplicabilidade como biotécnica reprodutiva em animais.

Palavras-chave: Clonagem Animal, Biotécnica da Reprodução, Reprodução Animal, Transferência Nuclear de Célula Somática, Embriões, Genética, Medicina Veterinária, Biomedicina, Bem-Estar Animal, Ética.

ABSTRACT

Animal cloning is a reproductive biotechnology in which an animal genetically identical to another is generated, using cells as providers of genetic material for the organism to be cloned. The most widely used technique for cloning is somatic cell nuclear transfer (SCNT), which can be performed using cells of several origins, including embryos, fetuses and adult animals. Cloning by SCNT is a complex technique that requires caution during the execution of the different procedures, which can be performed using micromanipulation or manually (Handmade Cloning), requiring biological materials and specific pieces of equipment to be successfully conducted. Despite the advances that animal cloning has achieved over time, its efficiency is still low, with a reduced number of animals reaching term and surviving after birth.. This is probably due to faulty epigenetic reprogramming that embryos undergo after reconstruction. The problems observed can be diverse, being expressed as: pregnancy losses, abnormal fetal development, excessive prenatal growth or even dysregulations in different body systems, observed in postnatal life. Cloning is mainly used in Veterinary Medicine, either for applications to farm animals, pets, or even endangered species. In addition, there are still biomedical applications aimed at the use of genetically modified animals for production traits or the environment, the production of recombinant proteins for human use, cellular therapies or as models for research of diseases and as providers of organs and tissues for xenotransplantation. One of the problems that can be observed in animals undergoing cloning or involved in the process (such as surrogate mothers) is animal welfare, especially regarding levels of pain and suffering to which these animals may be subjected. The technique still raises ethical and moral issues, especially when considering its possible application in humans, or in the case of consumption of food originated from genetically modified animals. The veterinarian is a central player in this process, assisting in the understanding of the science and biology that involves animal cloning. This literature review aimed to focus on different aspects of animal cloning, highlighting the history, the physiology and the social scenarios of its applicability as a reproductive biotechnology in animals.

Keywords: Animal Cloning, Reproductive Biotechnology, Animal Reproduction, Somatic Cell Nuclear Transfer, Embryos, Genetics, Veterinary Medicine, Biomedicine, Animal Welfare, Ethics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das principais etapas e materiais utilizados para realização da clonagem animal por TNCS, representando a espécie suína.....	15
Figura 2. Etapas da clonagem pela técnica convencional da transferência nuclear de célula somática (TNCS).....	16
Figura 3. Aparelho de eletrofusão e eletroporação, modelo ECM 2001 da marca BTX.....	18
Figura 4. Etapas da clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS) pela técnica de Handmade Cloning (HMC), na espécie bovina.....	19
Figura 5. Complexos cumulus-oócito (CCOs) e oócitos da espécie bovina.....	21
Figura 6. Câmara de eletrofusão, modelo BTX453, com espaço de 3,2 mm entre eletrodos.....	24
Figura 7. Avaliação da evolução da gestação de fêmeas receptoras bovinas, evidenciando a taxa de prenhez nos diferentes meses de gestação, comparando os quatro grupos de gestantes.....	30
Figura 8. Primeiro felino doméstico clone e a gata doadora de células.....	47
Figura 9. Primeiro cachorro clone, o doador de células e a fêmea receptora.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ordem cronológica das espécies animais de mamíferos clonadas por transferência nuclear de célula somática (TNCS) de indivíduos adultos, com o ano de nascimento do primeiro indivíduo e/ou a primeira publicação correspondente.....	13
Tabela 2. Problemas clínicos mais comuns observados em animais clonados, em diferentes espécies animais.....	34
Tabela 3. Sistemas corporais em que anormalidades foram observadas em clones neonatos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração Intracelular de Cálcio
6-DMAP	Dimetilaminopurina
AOS	<i>Abnormal Offspring Syndrome</i>
APC/C	Complexo Promotor de Anáfase/Ciclossoma
BSA	Albumina Sérica Bovina
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CHX	Ciclohexamida
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
DG	Diacilglicerol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ER	Retículo Endoplasmático
FBS	Soro Fetal Bovino
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
Gal	Galactose- α 1,3-galactose
GGTA1	α -1,3-galactosiltransferase
h	Hora
HMC	<i>Handmade Cloning</i>
IA	Inseminação Artificial
IGF-I	Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1
IM	Intramuscular
IO	Ionicina
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
kHz	Kilohertz
LH	Hormônio Luteinizante
mg	Miligrama
MII	Metáfase da Meiose II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>

mL	Mililitro
mm	Milímetro
n°	Número
MPF	Fator de Promoção da Maturação
O ₂	Oxigênio
PAG	Glicoproteína Associada à Gestação
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PIP2	Fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato
PLCζ	Fosfolipase C zeta
PSP60	Proteína Sérica Gestacional 60
PSPB	Proteína B Gestacional Específica
SOFm	Fluido Sintético de Oviduto Modificado
TCM	Meio de Cultivo de Tecidos
TE	Transferência Embrionária
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Célula Somática
UV	Ultravioleta
V	Volt
WOW	<i>Well-of-the-well</i>
ZP	Zona Pelúcida
μs	Microsegundo
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Perspectiva Histórica	10
2.2 Técnicas de Clonagem	14
2.2.1 Partição Embrionária	14
2.2.2 Clonagem por Transferência Nuclear de Célula Somática (TNCS).....	14
2.2.2.1 <i>Técnica Convencional de Clonagem por TNCS</i>	15
2.2.2.2 <i>Técnica de <u>Handmade Cloning</u> (HMC)</i>	17
2.2.2.3 <i>Comparação entre as Técnicas de Clonagem por TNCS</i>	18
2.3 Etapas da Clonagem Animal por TNCS	20
2.3.1 Preparação e Maturação dos Oócitos.....	20
2.3.2 Preparação dos Citoplastos	22
2.3.3 Preparação e Cultivo das Células Doadoras de Núcleo.....	22
2.3.4 Reconstrução Embrionária.....	23
2.3.5 Ativação Oocitária	24
2.3.6 Cultivo dos Embriões	26
2.3.7 Transferência Embrionária (TE).....	27
2.4 Gestação e Cuidados Neonatais dos Indivíduos Clonados	28
2.4.1 Escolha das Fêmeas Receptoras	28
2.4.2 Monitoramento e Perdas Gestacionais.....	29
2.4.3 Parto.....	31
2.4.4 Cuidados Pós-Natais com o Neonato	32
2.5 Anomalias do Desenvolvimento dos Clones	32
2.5.1 Problemas Pré-Natais em Clones.....	34
2.5.1.1 <i>Anormalidades Placentárias</i>	35
2.5.1.2 <i>Crescimento Anormal</i>	37
2.5.2 Problemas Clínicos Pós-Natais em Clones.....	37
2.6 Aplicabilidade da Clonagem Animal	39
2.6.1 Replicação de Animais de Produção	39
2.6.2 Produção de Animais Transgênicos.....	40

2.6.3	Aplicações na Biomedicina	42
2.6.3.1	<i>Terapias Celulares</i>	42
2.6.3.2	<i>Produção de Biorreatores</i>	43
2.6.3.3	<i>Animais como Modelos para Pesquisa</i>	43
2.6.3.4	<i>Xenotransplantes</i>	44
2.6.4	Preservação de Espécies Animais Ameaçadas de Extinção	45
2.6.5	Outras Aplicações	46
2.7	Questões Relacionadas à Saúde e ao Bem-Estar Animal	48
2.8	Preocupações Éticas Relacionadas à Clonagem	49
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

1 INTRODUÇÃO

A clonagem animal é uma biotécnica da reprodução conhecida há muitas décadas pelos pesquisadores, sendo que os primeiros experimentos envolvendo clonagem datam do século XIX (VAJTA; GJERRIS, 2006). Clone é uma palavra derivada de *klon*, que em grego, significa galho ou broto. Em horticultura, os galhos são derivados de uma única planta, e consequentemente carregam o mesmo material genético (FOOTE, 2002). A clonagem animal pode ser descrita como o processo de criação de réplicas genotipicamente idênticas de uma célula ou de um organismo (SINHA *et al.*, 2019). De acordo com Brooks e Lusk (2011), o processo de clonagem animal pode ser caracterizado como a cópia da genética de um animal.

Na natureza, existem vários exemplos de clonagem como uma ferramenta de reprodução assexuada, como pode ser observado em plantas e animais invertebrados: o brotamento (águas-vivas), a fragmentação (minhocas) e a partenogênese (abelhas; VAJTA; GJERRIS, 2006). Em mamíferos, o exemplo clássico são os gêmeos idênticos, que ocorrem devido à divisão de um zigoto ou de um embrião nos estádios iniciais da divisão celular. Neste caso, ambos os indivíduos terão material genético idêntico (FOOTE, 2002).

Dentre as técnicas de clonagem, a mais utilizada atualmente é a clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS), a qual utiliza oócitos enucleados como citoplasma receptor (citoplasto) e células nucleadas como doadoras do núcleo (carioplasto). Depois de reconstruído e ativado, o embrião é transferido para uma receptora, a qual prosseguirá com a gestação (PEREIRA; FREITAS, 2009).

Apesar de a técnica abrir inúmeras possibilidades em áreas da Medicina e da reprodução animal, existem diferentes relatos de problemas provenientes da clonagem. Quando comparada a outras biotécnicas reprodutivas, as perdas embrionárias, fetais e no período neonatal são maiores, o que resulta na diminuição da eficiência e no aumento dos custos relacionados à técnica. Alterações em diferentes sistemas podem ser observadas, originadas no período pré- e no pós-natal, diminuindo as chances de vida dos clones (PEREIRA *et al.*, 2020).

Em relação à aplicabilidade da clonagem, existem diferentes áreas que podem ser beneficiadas por essa biotécnica reprodutiva. Dentre essas, podemos destacar: preservação de espécies animais ameaçadas de extinção, replicação de animais de produção com características fenotípica e/ou genotipicamente desejáveis, produção de animais transgênicos, e em aplicações na biomedicina, incluindo terapias celulares, animais transgênicos utilizados como biorreatores, animais como modelos de pesquisa e animais utilizados como provedores

de órgãos para xenotransplantes (BORDIGNON, 2017). Além dessas, também existem aspectos comerciais beneficiados pela clonagem animal, caracterizados pelo melhor desempenho produtivo dos animais, e pela produção de produtos diferenciados que são de interesse da população humana (LEWIS *et al.* 2004).

Apesar de todas essas aplicações benéficas proporcionadas pela clonagem, ainda existem problemas éticos que circundam a técnica, já que uma parte da população considera a clonagem animal como imoral (FIESTER, 2005). Green (2002) coloca que alguns dos medos e apreensões daqueles que se manifestam contra a clonagem animal usualmente têm por fundamento conceitos científicos errôneos. Entretanto, existem aqueles questionamentos que de fato são reais e substanciais. Além dos problemas éticos, também existem aqueles relacionados às questões de bem-estar dos animais submetidos ao processo de clonagem (ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre aspectos envolvendo a clonagem animal, e tendo este um caráter informativo, auxiliar na aquisição de conhecimento sobre este assunto. O trabalho apresenta uma abordagem histórica, fisiológica, social e de aplicabilidade em diferentes cenários da reprodução animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Perspectiva Histórica

A clonagem é um método utilizado na natureza para reprodução, também sendo reconhecida como reprodução assexuada. Existem vários exemplos de espécies que utilizam essa forma de reprodução (FOOTE, 2002). Em animais invertebrados, esse tipo de reprodução também pode ser observado, tendo-se como exemplo, as minhocas e as planárias, que ao serem divididas, formarão indivíduos geneticamente idênticos (GURDON; COLMAN, 1999). Alguns dos métodos para reprodução assexuada em animais são: brotamento, observado em águas-vivas, tênias e corais; fragmentação, observada em minhocas; e partenogênese, observada em algumas espécies de peixes, insetos, sapos e lagartos (VAJTA; GJERRIS, 2006).

Já em mamíferos, o exemplo clássico de clonagem natural é a existência de gêmeos idênticos (univitelinos), os quais são originários de um mesmo zigoto ou embrião que, em seu estágio inicial de multiplicação celular, acaba separando-se, dando origem a indivíduos com o mesmo material genético (FOOTE, 2002).

A partir deste conhecimento, pesquisadores iniciaram experimentos com o intuito de clonar os animais artificialmente. Os primeiros experimentos com clonagem animal datam do final do século XIX. Em 1891, Hans Driesch separou os blastômeros de um embrião de duas células de um ouriço-do-mar, por meio de agitação mecânica da água. Os blastômeros começaram suas divisões celulares de forma independente, gerando cada um, um novo indivíduo (DRIESCH, 1891). Onze anos depois, em 1902, Hans Spemann realizou um experimento semelhante, desta vez em animais vertebrados, as salamandras (SPEMANN, 1902). Spemann utilizou um fio de cabelo de seu filho bebê para dividir um zigoto ao meio, sem seccionar, deixando metade com núcleo e metade sem. Quando a parte nucleada do embrião atingia um estágio de oito ou de dezesseis células, Spemann afrouxava a constrição feita pelo fio de cabelo, e permitia que um núcleo passasse para a porção sem material genético; neste lado, após a transferência do núcleo, também havia clivagem e desenvolvimento embrionário, dando origem a um clone de seu doador nuclear (McKINNELL; DI BERARDINO, 1999). Apesar de terem obtido sucesso, experimentos utilizando espécies de mamíferos levaram quase oitenta anos para ser realizados, devido principalmente à indisponibilidade de equipamentos de manuseio eficientes, e ao

desconhecimento de que oócitos e embriões mamíferos necessitam de temperatura estritamente controlada para seu adequado desenvolvimento (BAVISTER, 2002).

Ainda no século XIX, uma abordagem completamente diferente de reprodução assexuada foi descoberta acidentalmente por Jacques Loeb, em 1894. Também trabalhando com ouriços-do-mar, Loeb, na tentativa de induzir a partenogênese utilizando diferentes concentrações de sal nos embriões, ocasionalmente observou a formação de uma bolha de citoplasma em embriões de estádios iniciais de desenvolvimento, em soluções hipotônicas. Eventualmente, quando um núcleo adentrava essa bolha, ocorria desenvolvimento embrionário, mesmo quando separada do embrião original. O que Loeb descobriu foi um modelo primitivo de transferência nuclear, evidenciando que embriões podem se desenvolver quando ocorre transferência de núcleo entre células (LOEB, 1894).

Até 1938, os experimentos utilizando a transferência nuclear (TN) entre células, tinham como doadoras de núcleo, células embrionárias. Spemann sugeriu que poderiam ser utilizadas células já diferenciadas como doadoras de núcleo, e transferi-los para oócitos enucleados, tendo assim, a possibilidade de reverter o processo de diferenciação celular (SPEMANN, 1938). Segundo Foote (2002), Spemann também demonstrou em 1938 que núcleos de blastômeros de embriões de salamandras de até oito células eram pluripotentes.

Já em 1952, Briggs e King foram os primeiros a realizar a clonagem por TN, utilizando rãs como modelo experimental. A técnica utilizada foi a retirada do núcleo dos oócitos e a posterior inserção do núcleo doador. As células utilizadas como doadoras de núcleos foram inicialmente blastômeros de mórulas, e posteriormente células somáticas de girinos e do epitélio intestinal. O procedimento resultou em considerável sucesso no desenvolvimento inicial desses embriões, mas observou-se que quanto mais diferenciadas eram as células doadoras de núcleo, menor o sucesso obtido em estádios avançados do desenvolvimento embrionário (BRIGGS; KING, 1952).

Gurdon, em 1962, foi um dos cientistas que conseguiu produzir rãs férteis pela mesma técnica, utilizando como doadoras, células intestinais de girinos (GURDON, 1962). Por um tempo, foi disseminado no meio científico a ideia de que células somáticas especializadas não poderiam ser doadoras de núcleo, pois essas não poderiam ser reprogramadas para retornar à totipotência, devido a terem sofrido modificações irreversíveis no DNA. Grupos de pesquisadores, céticos do feito, sugeriram que as células originadas eram germinativas primordiais, já que nestes animais, tais células podem habitar o tubo digestivo. Outros ressaltaram que apenas a pluripotência pudesse ser atingida após a TN, o que não

possibilitaria a formação da placenta, indispensável para o desenvolvimento gestacional de mamíferos (FOOTE, 2002).

A primeira clonagem em mamíferos bem sucedida foi realizada na espécie murina, por Illmensee e Hoppe, em 1981, a partir da transferência nuclear de células embrionárias. Neste experimento, foi realizada a transferência de células de embriões de estádios iniciais para zigotos enucleados, resultando no nascimento de três camundongos (ILLMENSEE; HOPPE, 1981). Posteriormente, ninguém conseguiu repetir o experimento, nem mesmo os próprios autores, o que levantou a suspeita de que o artigo era fraudulento, e após tentativas mal sucedidas em utilizar o procedimento descrito, embriologistas da época declararam que a clonagem de mamíferos pela transferência nuclear era impossível (McGRATH; SOLTER, 1984).

Entretanto, nem todos os cientistas aceitaram este fato. Em 1986, Steen Malte Willadsen realizou uma nova tentativa em utilizar o procedimento de Illmensee e Hoppe, desta vez na espécie ovina. Após aperfeiçoar a técnica e mesmo assim continuar sem sucesso, Willadsen tentou utilizar oócitos ao invés de zigotos como recipientes das células doadoras de núcleo. A técnica funcionou, dando origem ao nascimento de ovinos clonados a partir de blastômeros (WILLADSEN, 1986). Posteriormente, a mesma técnica foi utilizada por outros cientistas, gerando o nascimento de clones das espécies bovina (PRATHER *et al.*, 1987) e suína (PRATHER; SIMS; FIRST, 1989), a partir da transferência nuclear de células embrionárias.

A ovelha Dolly foi o primeiro clone mamífero produzido a partir de células somáticas, neste caso, oriundas da glândula mamária de uma ovelha adulta como doadoras de núcleo, sendo assim, a primeira clonagem derivada de células somáticas especializadas que resultou em um indivíduo vivo (BORDIGNON, 2017). O nascimento de Dolly, em 1996, experimento realizado por Wilmut *et al.* (1997), foi necessário para a aceitação de que era possível utilizar células somáticas de um animal adulto como doadoras de núcleo, realizando a transferência nuclear de célula somática (TNCS) para um oócito enucleado. Desta forma, Dolly tornou-se o exemplo vivo de que a clonagem por TNCS é efetiva, criando-se um dos marcos da biologia do desenvolvimento, surpreendendo a maioria dos pesquisadores. A partir disso, fez-se necessário atualizar os materiais didáticos de biologia do desenvolvimento, apresentando ao mundo novidades científicas e comerciais, mas também, abrindo margem para desafios éticos (VAJTA; GJERRIS, 2006).

De acordo com McKinnell e Di Berardino (1999), mesmo a Dolly não sendo o primeiro animal clonado, sua fama provavelmente foi muito maior devido ao fato de ela ter

sido clonada a partir de células de um animal adulto, o que fez com que cientistas e profissionais de áreas sociais contemplassem a possibilidade de clonar humanos.

A Tabela 1 mostra em ordem cronológica quais os primeiros exemplares de cada espécie animal em que já se obteve sucesso na clonagem a partir de células somáticas de adultos.

Tabela 1. Ordem cronológica das espécies animais de mamíferos clonadas por transferência nuclear de célula somática (TNCS) de indivíduos adultos, com o ano de nascimento do primeiro indivíduo e/ou a primeira publicação correspondente.

Número	Espécie Animal (Nome do Clone)	Ano	Primeira Publicação
1	Ovino (Dolly)	1996	Wilmot <i>et al.</i> (1997)
2	Camundongo (Cumulina)	1998	Wakayama <i>et al.</i> (1998)
3	Bovino	1998	Kato <i>et al.</i> (1998)
4	Cabra (CFF6-1)	1999	Baguisi <i>et al.</i> (1999)
5	Porco	2000	Polejaeva <i>et al.</i> (2000)
6	Gauro (<i>Bos gaurus</i>)	2000	Lanza <i>et al.</i> (2000)
7	Muflão (<i>Ovis orientalis musimon</i>)	2000	Loi <i>et al.</i> (2001)
8	Gato (CC)	2001	Shin <i>et al.</i> (2002)
9	Coelho	2002	Chesné <i>et al.</i> (2002)
10	Rato	2002	Zhou <i>et al.</i> (2003)
11	Mula (Idaho Gem)	2003	Woods <i>et al.</i> (2003)
12	Cavalo (Prometea)	2003	Galli <i>et al.</i> (2003)
13	Gato-selvagem-africano (Ditteaux)	2003	Gómez <i>et al.</i> (2004)
14	Bantengue (<i>Bos javanicus</i>)	2004	Janssen <i>et al.</i> (2004)
15	Cachorro (Snuppy)	2005	Lee <i>et al.</i> (2005)
16	Furão (Libby e Lilly)	2006	Li <i>et al.</i> (2006)
17	Lobo (Snuwolf)	2007	Kim <i>et al.</i> (2007)
18	Bucardo (<i>Capra pyrenaica pyrenaica</i>)	2008	Folch <i>et al.</i> (2009)
19	Búfalo	2008	Shah <i>et al.</i> (2009)
20	Dromedário	2009	Wani <i>et al.</i> (2010)

2.2 Técnicas de Clonagem

2.2.1 Partição Embrionária

Os primeiros experimentos com clonagem utilizaram a técnica da desagregação de blastômeros ou da divisão embrionária em duas metades, e desta forma, ambas as partes se desenvolveriam, formando indivíduos diferentes, mas carregando o mesmo material genético (IBTISHAM *et al.*, 2017).

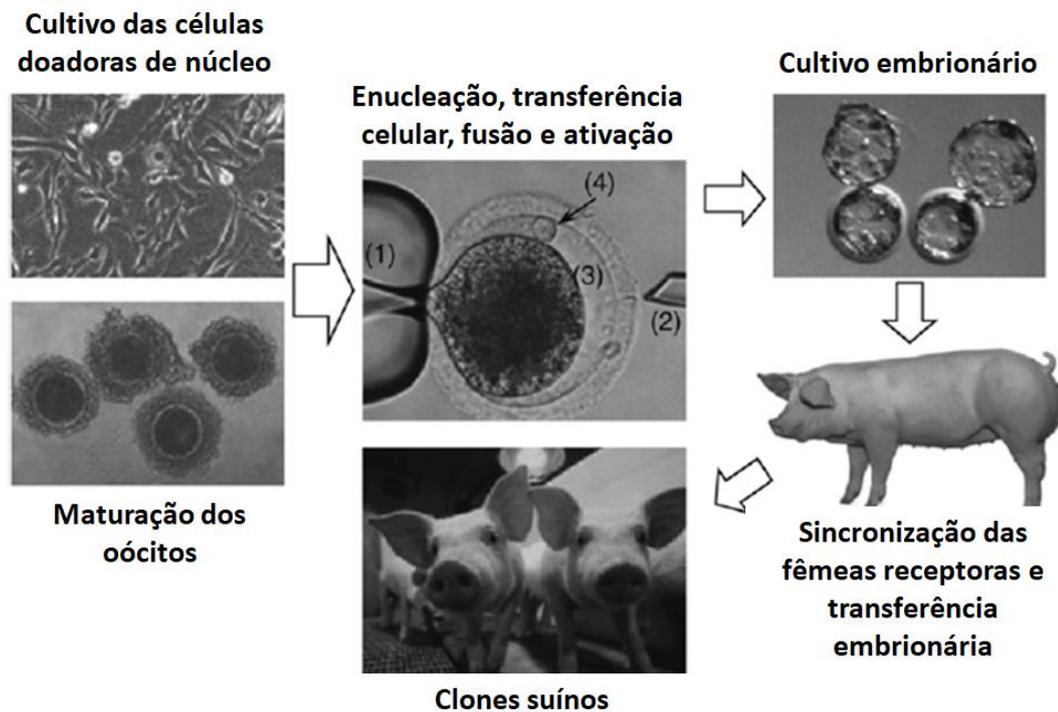
Segundo Vajta e Gjerris (2006), apesar da facilidade da técnica, ela não se mostra tão eficiente, isto porque um embrião só pode ser dividido por uma ou duas vezes, gerando dois ou no máximo quatro irmãos geneticamente idênticos.

2.2.2 Clonagem por Transferência Nuclear de Célula Somática (TNCS)

A clonagem por TNCS é uma técnica complexa, pois exige coordenação e implementação de vários passos técnicos para que se alcance o sucesso. Os elementos e procedimentos essenciais para a realização da técnica são: células doadoras de núcleo (carioplastos); oócitos maturados, que serão utilizados como citoplastos; manipulação celular (enucleação, transferência nuclear e fusão); ativação do oócito; cultivo do embrião reconstruído; sincronização das fêmeas receptoras e transferência embrionária (Figura 1; BORDIGNON, 2017).

Pelo menos duas metodologias básicas podem ser empregadas para realização da clonagem por TN. A clonagem por TNCS denominada convencional é a mais utilizada, sendo comumente realizada por meio da micromanipulação, essencialmente nas fases de enucleação do oócito e de transferência do carioplasto para o interior do citoplasto (oócito enucleado), sob a zona pelúcida (ZP). O outro procedimento que pode ser realizado é o *Handmade Cloning* (HMC), técnica que não utiliza micromanipuladores, sendo todas as etapas realizadas de maneira manual, como sugere o próprio nome (KHAN *et al.*, 2018; VAJTA *et al.*, 2001).

Figura 1. Representação das principais etapas e materiais utilizados para realização da clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS), representado na espécie suína. As células doadoras de núcleo são cultivadas *in vitro* a partir de tecidos do animal que será clonado. Oócitos maturados *in vitro* são utilizados como citoplastos receptores do núcleo, e normalmente são obtidos de fêmeas de abatedouro. A clonagem por TNCS geralmente é realizada por micromanipulação, e as etapas da técnica incluem a enucleação dos oócitos maturados, a transferência da célula somática sob a zona pelúcida do oócito, a fusão entre as estruturas (membranas celulares) e a ativação dos oócitos reconstruídos. Após, os embriões clones serão cultivados e posteriormente transferidos para uma fêmea receptora sincronizada. Os animais que nascerem serão clones daquele que se extraiu o tecido para obtenção das células somáticas. **1.** pipeta *holding*; **2.** pipeta de enucleação e construção; **3.** citoplasto; **4.** carioplasto.



Fonte: adaptado de Bordignon (2017, p. 3).

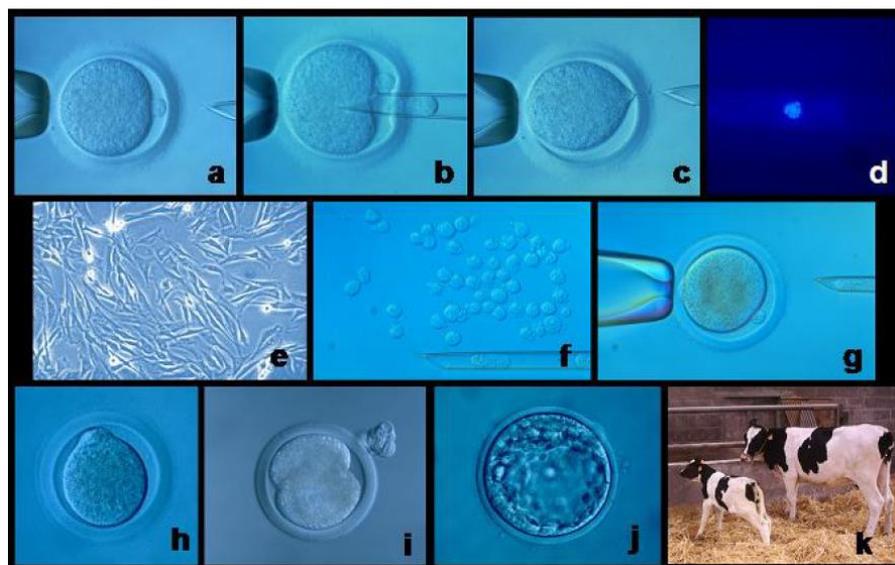
2.2.2.1 Técnica Convencional de Clonagem por TNCS

A técnica convencional de clonagem por TNCS (Figura 2) consiste no emprego de micromanipuladores para realização da enucleação dos oócitos maturados, mantendo os oócitos fixos e em posição adequada, utilizando pipetas do tipo *holding* e vácuo; a retirada do material genético é realizada por aspiração, utilizando uma pipeta com bisel para enucleação, perfurando a ZP. Outro procedimento realizado por micromanipulação é a introdução da célula doadora de núcleo através da ZP do oócito recém enucleado, utilizando uma pipeta de TN, a qual será direcionada ao local já perfurado da ZP, seguindo-se a deposição da célula com auxílio da pipeta, por meio de um microinjetor. A célula deve ser posicionada na

extremidade da pipeta, a fim de reduzir ao mínimo a quantidade de meio de cultivo, para que se estabeleça um bom contato entre as membranas da célula e do oócito após a injeção, melhorando a eficiência da fusão. As pipetas para enucleação e para TN são basicamente iguais, sendo que a pipeta de TN pode ser maior, dependendo do diâmetro da célula transferida, podendo-se utilizar a mesma pipeta para os dois processos (HEYMAN, 2005; IBTISHAM *et al.*, 2017; PAGE, 2002).

Essa técnica exige manipulação delicada com o uso dos micromanipuladores, que são instrumentos custosos, especiais e complexos. Além disto, os técnicos devem receber treinamento especial para o adequado manuseio e emprego dos equipamentos, destacando-se a preparação das micropipetas utilizadas. As diferentes etapas da clonagem por TNCS exigem, além da qualificação dos técnicos, considerável investimento em equipamentos (KHAN *et al.*, 2018).

Figura 2. Etapas da clonagem pela técnica convencional de transferência nuclear de célula somática (TNCS). **a.** oócito maturado e desnudo, em metáfase II, antes da enucleação; **b.** aspiração do corpúsculo polar e do citoplasma adjacente com o material genético do oócito por micromanipulação; **c.** oócito recém enucleado; **d.** material genético dentro da micropipeta corado com fluorocromo para DNA, para controle da remoção do material genético; **e.** cultivo celular de fibroblastos; **f.** fibroblastos isolados do cultivo celular, sendo categorizados como as células doadoras de núcleo; **g.** inserção por micromanipulação da célula doadora de núcleo sob a zona pelúcida do oócito enucleado; **h.** processo de fusão entre a célula doadora de núcleo e o citoplasma do oócito; **i.** primeira clivagem do embrião reconstruído (embrião de duas células); **j.** blastocisto desenvolvido *in vitro*, originado da clonagem por TNCS; **k.** bezerro clone recém-nascido ao lado do doador do material genético.



Fonte: Heyman (2005, p. 356).

2.2.2.2 Técnica de *Handmade Cloning* (HMC)

A técnica de *Handmade Cloning* (HMC; Figura 4) é uma técnica alternativa, relativamente barata e eficiente (KHAN *et al.*, 2018; VAJTA *et al.*, 2001). A HMC é realizada manualmente, sem a necessidade do emprego de equipamentos sofisticados (VAJTA, 2007; VAJTA *et al.*, 2001). Nesta técnica, ZP é removida após a maturação dos oócitos e antes da enucleação, com os procedimentos feitos de maneira mais artesanal, não utilizando a micromanipulação. (VAJTA *et al.*, 2005).

O descarte do material genético é feito a partir da bipartição manual do oócito, já maturado e sem ZP, em um meio contendo citocalasina B, um agente despolimerizador de actina. Com o auxílio de uma lâmina microcirúrgica, o mais comum é que os oócitos sejam bipartidos, gerando hemi-oócitos, um contendo material genético e o outro não, o que será identificado através da coloração com fluorocromos para DNA, como o Hoechst 33342. Após a exposição dos hemi-oócitos ao fluorocromo, estes são examinados em microscopia de epifluorescência (com luz ultravioleta, UV), revelando aqueles que contêm a cromatina; as metades selecionadas para servirem como citoplasto serão as que não apresentam material genético. Devido à redução de citoplasma causada pela bipartição oocitária, o HMC preconiza o emprego de dois citoplastos na reconstrução do embrião clone. Desta forma, essas duas estruturas são justapostas com auxílio da fitohemaglutinina (que funciona como uma cola biológica), e em seguida, a célula somática é adicionada ao conjunto de hemi-oócitos, também com auxílio da fitohemaglutinina (LI; WHITE; BUNCH, 2004; KHAN *et al.*, 2018; VAJTA, 2007; VAJTA *et al.*, 2001).

A próxima etapa é a fusão das estruturas agregadas, que é realizada com auxílio de um eletrofusor (Figura 3), que faz passar uma corrente elétrica de corrente contínua através das estruturas. Para o cultivo *in vitro* dos embriões, principalmente os sem zona pelúcida, a maneira mais eficiente encontrada foi utilizar o sistema de micropoços modificado, conhecido como *well-of-the-well* (WOW). Este método consiste no cultivo individual dos embriões, o que é necessário para que não haja agregação entre os embriões reconstruídos sem ZP. O sistema WOW oferece benefícios únicos a esses embriões, dentre os quais se destacam a manutenção dos blastômeros unidos (mesmo sem a presença da ZP) e o fornecimento de um microambiente estável para o adequado desenvolvimento embrionário (VAJTA, 2007). Em nosso laboratório (Embriologia e Biotécnicas de Reprodução), Cristiano Feltrin conduziu um

experimento que contribuiu para o aumento da eficiência do cultivo *in vitro* dos embriões clonados através da HMC, modificando o sistema de cultivo WOW (FELTRIN *et al.*, 2006).

Gerger *et al.* (2017) conduziram um experimento em que foi avaliado o desenvolvimento embrionário *in vitro*, estando esse diretamente relacionado com as habilidades técnicas dos operadores. Os resultados revelaram que a experiência, associada ao aumento da competência na realização da técnica, influenciaram diretamente na qualidade dos embriões, mostrando que a clonagem por HMC necessita de laboratoristas treinados para que se alcance o sucesso.

Figura 3. Aparelho de eletrofusão e eletroporação, modelo ECM 2001 da marca BTX.



Fonte: a própria autora (2019).

2.2.2.3 Comparação entre as Técnicas de Clonagem por TNCS

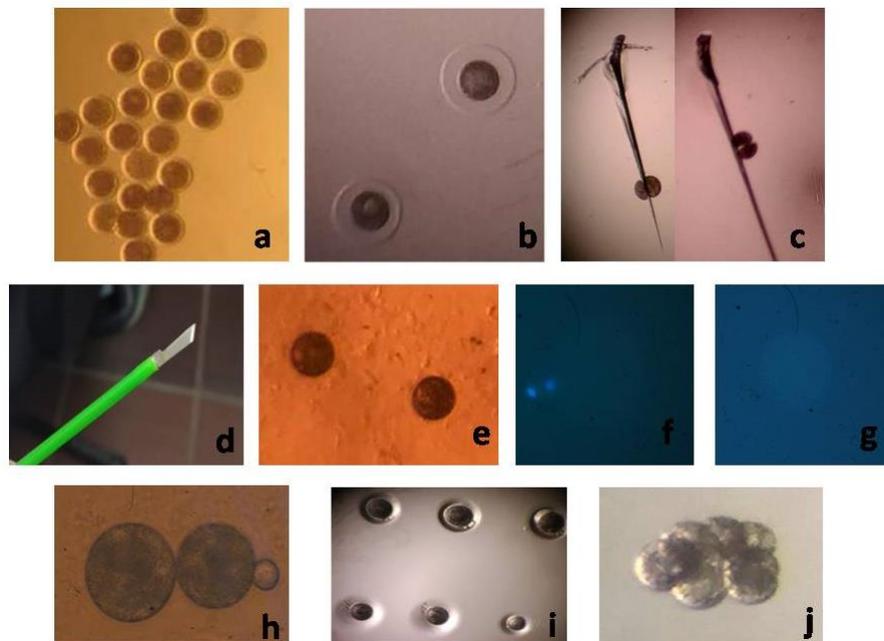
Tanto a técnica de clonagem convencional quanto a técnica HMC são eficientes na produção de clones. Apesar disso, a técnica convencional exige materiais e equipamentos mais sofisticados, além de técnicos altamente treinados (KHAN *et al.*, 2018; VAJTA; GJERRIS, 2006). Por outro lado, a técnica HMC mostra-se econômica em termos laboratoriais, é simples e eficiente, tendo sua eficácia comprovada principalmente na espécie bovina. A principal diferença observada na HMC em relação à clonagem por TNCS convencional é que não é necessário o uso de micromanipuladores para realizar a enucleação e a transferência da célula somática, o que reduz consideravelmente os custos associados aos equipamentos do laboratório (BORDIGNON, 2017; KHAN *et al.*, 2018).

Khan *et al.* (2018) compararam a eficiência da produção *in vitro* e do desenvolvimento embrionário *in vitro* entre as duas técnicas de clonagem por TNCS na espécie ovina. Os

resultados obtidos foram: eficiência de enucleação com variação sem significância estatística; eficiência de fusão entre carioplasto e célula somática superior pela técnica HMC; taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto também foram superiores pela técnica de HMC. Estes resultados provavelmente devem-se a maior quantidade de citoplasma presente nos embriões produzidos por HMC (dois hemi-óocitos). Os autores concluíram que na espécie ovina, a clonagem por HMC é mais eficiente em relação à clonagem por TNCS convencional.

Feltrin *et al.* (2006) conduziram um experimento onde reduziram as dimensões do micropoço descrito no HMC (VAJTA *et al.*, 2001) e alcançaram maiores percentuais de desenvolvimento embrionário em relação ao procedimento original.

Figura 4. Etapas da clonagem por TNCS pela técnica de *Handmade Cloning* (HMC), na espécie bovina. **a.** óocitos maturados e desnudos; **b.** óocitos maturados em processo de remoção da zona pelúcida (ZP); **c.** óocitos sem ZP bipartidos; **d.** lâmina utilizada para a bipartição manual dos óocitos; **e.** dois hemi-óocitos após a bipartição; **f.** hemi-óocito corado com Hoechst 33342, observado sob microscópio com luz UV, apresentando a cromatina corada; **g.** hemi-óocito corado com Hoechst 33342, observado sob microscópio com luz UV, sendo que este não apresenta cromatina; **h.** dois hemi-óocitos sem cromatina colados à uma célula somática por fitohemaglutinina; **i.** micropoços do sistema *well-of-the-well* (WOW) contendo os embriões clones para cultivo *in vitro*; **j.** embrião clone clivado no estágio de 8-células.



Fonte: a própria autora (2019).

2.3 Etapas da Clonagem Animal por TNCS

A realização da clonagem compreende várias etapas e processos biológicos, e a realização de cada um deles será indispensável para que se alcance o sucesso da técnica.

2.3.1 Preparação e Maturação dos Oócitos

A qualidade dos oócitos após a enucleação, denominados citoplastos, é importante para o sucesso da clonagem, já que eles são responsáveis pela reprogramação do núcleo da célula somática, disponibilizando a maquinaria citoplasmática que suportará o desenvolvimento embrionário (BORDIGNON, 2017; FELTRIN *et al.*, 2017; ONGARATTO *et al.*, 2020).

Na espécie bovina, geralmente, os citoplastos têm origem em oócitos obtidos através da aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro, os quais são submetidos à maturação *in vitro* (MIV) e posteriormente à enucleação (WELLS, 2005). Segundo Bordignon (2017), existe a possibilidade de se obter os oócitos já maturados e ovulados, de fêmeas vivas, utilizando-se tratamentos hormonais e posterior coleta *in vivo* desses oócitos. Apesar disso, para a clonagem de animais domésticos de grande porte, sugere-se a utilização dos oócitos de fêmeas abatidas, principalmente por questões de custos, viabilidade e problemas envolvendo bem-estar animal que a técnica *in vivo* apresenta. Para Vajta e Gjerris (2006), a abundância de oócitos coletados *post-mortem*, somado ao baixo custo, compensa o fato dessas células apresentarem diferença na qualidade, quando comparados aos oócitos obtidos *in vivo*. Já Campbell *et al.* (2007) acreditam que oócitos maturados *in vitro* proporcionam um controle melhor sobre a maturação, permitindo a coleta de oócitos em estádios definidos durante a MIV. Além disso, os autores destacam que o oócito maturado *in vivo* é afetado por fatores como a idade das fêmeas doadoras e a utilização de protocolos de superovulação.

Feltrin *et al.* (2017) constataram que em caprinos, a taxa de maturação dos oócitos foi maior naqueles coletados *in vivo*. Por outro lado, os oócitos maturados *in vitro*, provenientes de ovários de cabras abatidas, apresentaram taxas de sobrevivência após a enucleação e após a reconstrução embrionária superiores aos oócitos maturados *in vivo*. Na taxa de prenhez, não houve diferença observada entre os dois grupos. Pereira *et al.* (2013) também consideraram os oócitos provindos de ovários de abatedouro como adequados para utilização como citoplastos.

Os ovários coletados devem ser mantidos em solução salina e à temperatura constante de 25-30°C. A aspiração folicular (os folículos devem apresentar diâmetro superior a 3 mm), é realizada coletando-se os complexos *cumulus*-oócito (CCOs), contendo oócitos imaturos (Figura 5). Após a identificação, os CCOs são selecionados com base em aspectos morfológicos, tanto dos oócitos quanto das células do *cumulus*. Para realização da clonagem, é necessário que os oócitos estejam maturados, ou seja, que tenham chegado à metáfase da meiose II (MII), caracterizada pela presença do corpúsculo polar no espaço perivitelino. Para tal, os CCOs são mantidos em um meio de maturação *in vitro* (MIV), o qual é composto por meio de cultivo de tecidos (TCM-199) modificado, suplementado com soro fetal bovino (FBS), albumina sérica bovina (BSA), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), 17- β -estradiol, alguns fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I), piruvato de sódio e antibióticos. Os CCOs são colocados em gotas desse meio de maturação, cobertos por óleo mineral e permanecem em incubadora sob atmosfera úmida de 5% de CO₂ e 95% de ar, em temperatura de 38,5°C. O tempo da MIV é variável dependendo da espécie, sendo de 20-24 h para ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos), 24-36 h para equinos, e 42-46 h para suínos. Após a MIV, as células do *cumulus* são removidas mecanicamente por pipetagem e/ou enzimaticamente, utilizando um agitador vortex com uma solução tamponada de hialuronidase a 0,1%, e após o desnudamento, os oócitos são selecionados de acordo com a presença do corpúsculo polar extrusado e por sua morfologia (Figura 5; BORDIGNON, 2017).

Figura 5. Complexos *cumulus*-oócito (CCOs) e oócitos da espécie bovina. Oócitos imaturos (a, b) e maturados (c,d). Também se observa a expansão das células do *cumulus* no CCO maturado (c) e a presença do corpúsculo polar extrusado no oócito maturado (d), apontado pela seta preta.



Fonte: adaptado de Bordignon (2017, p. 3).

2.3.2 Preparação dos Citoplastos

Após a MIV, o passo seguinte do protocolo da clonagem é a enucleação dos oócitos, ou seja, a retirada do material genético desses gametas. Para tal, existem diferentes técnicas, as quais podem ser realizadas na presença ou na ausência da ZP, conforme já descrito, utilizando micromanipuladores ou técnicas manuais (HMC), enucleação mecânica ou química, enucleação com auxílio de fluorescência ou não. Apesar da grande variedade de opções, o protocolo mais utilizado consiste na enucleação mecânica da cromatina através de sua aspiração por uma micropipeta. Além disso, geralmente esse protocolo envolve a incubação dos oócitos em citocalasina B e com fluorocromos específicos para DNA, sendo que o mais utilizado é o Hoechst 33342 (BORDIGNON, 2017). Com a remoção do material genético, este oócito é denominado citoplasto, ou seja, uma estrutura que contém apenas citoplasma. Apesar disso, ele ainda conterá material genético mitocondrial (WELLS, 2005).

2.3.3 Preparação e Cultivo das Células Doadoras de Núcleo

Após a produção dos primeiros mamíferos clonados a partir de células de linhagens embrionárias, fetais e adultas, diferentes estudos evidenciaram que células somáticas podem ser utilizadas para a clonagem (CAMPBELL *et al.*, 2007). Essas células podem ser derivadas de vários tecidos, e também, de animais de diferentes idades, como fetos, recém nascidos, adultos, idosos e até mesmo de animais mortos, por um curto período *post-mortem* (VAJTA; GJERRIS, 2006). As células doadoras de núcleo são também chamadas de carioplastos (PEREIRA; FREITAS, 2009).

Segundo Bordignon (2017), a clonagem a partir de células somáticas geralmente é feita utilizando-se cultivos celulares derivados de biópsias de tecidos animais. A linhagem celular também é um dos fatores de importância na eficiência da clonagem. Apesar de vários tipos de células estarem disponíveis, existem algumas que apresentam maior eficiência na produção de clones do que outras. Dentre essas, os fibroblastos da pele têm sido as células preferencialmente utilizadas para a clonagem de animais de fazenda, até porque, uma biópsia de pele é facilmente obtida em animais vivos. Já para a produção de animais transgênicos, dá-se preferência para células fetais, podendo também ser fibroblastos. O motivo para tal é que células fetais, normalmente, apresentam capacidade proliferativa *in vitro* por períodos mais longos do que aquelas derivadas de animais adultos. Vajta e Gjerris (2006) relatam que

células derivadas de tecidos presentes no trato genital feminino, como células da granulosa e do epitélio do oviduto, também apresentam alta eficácia na geração de clones.

Os procedimentos utilizados no estabelecimento de cultivos celulares primários vão depender do tipo celular. No exemplo dos fibroblastos, estes são obtidos a partir de uma biópsia de pele estéril, de 1-2 cm², após tricotomia e assepsia local da área de coleta. Essa amostra de tecido é lavada diversas vezes, e a epiderme é removida utilizando uma lâmina de bisturi estéril. O restante do tecido é seccionado em amostras de 3-4 mm e colocado para cultivar. Essas células podem ser mantidas em cultivos por muitas passagens, ou ainda, criopreservadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Geralmente, os animais clonados são produzidos a partir de células que não tiveram muitas passagens no cultivo (geralmente menos de seis; BORDIGNON, 2017).

2.3.4 Reconstrução Embrionária

A reconstrução do embrião consiste na transferência da célula doadora (carioplasto) para o espaço perivitelino do oócito enucleado (citoplasto), geralmente por micromanipulação (HEYMAN, 2005; PEREIRA; FREITAS, 2009). Para a adequada fusão entre as membranas da célula doadora de núcleo e do oócito enucleado, aplica-se um ou mais pulsos elétricos de corrente contínua em um sistema de eletroporação (BORDIGNON, 2017). Esta mesma estimulação elétrica pode ser usada como uma maneira de ativar o citoplasto (CAMPBELL *et al.*, 2007).

Segundo Bordignon (2017), geralmente, os embriões reconstruídos serão colocados individualmente ou em pequenos grupos (cinco a dez estruturas) em uma câmara de eletrofusão (Figura 6), contendo um meio de eletrofusão, que ficará entre dois eletrodos, os quais estão conectados ao eletroporador (Figura 3). Quanto às condições para a fusão, pode haver variações, principalmente relacionadas à espécie, ao tipo celular, ao equipamento de eletroporação e ao meio de eletrofusão. As correntes elétricas que serão utilizadas são: um pré-pulso de corrente alternada (5-6 V; 600-1000 kHz; 5-10 μ s) para alinhamento dos embriões reconstruídos, para que estes fiquem em posição paralela aos eletrodos associados à câmara de fusão; e posteriormente, um ou mais pulsos de corrente contínua (1-3,5 kV cm⁻¹; 30-250 μ s), para indução da poração das membranas celulares e fusão. O meio de fusão é considerado como uma solução de baixa condutividade, o qual tem como função, prevenir qualquer tipo de dano ao embrião reconstruído quando aplicadas as correntes elétricas. Os

componentes desse meio geralmente são: manitol, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e BSA, com pH ajustado para 7,2-7,4.

Figura 6. Câmara de eletrofusão, modelo BTX453, com espaço de 3,2 mm entre eletrodos.



Fonte: a própria autora (2019).

2.3.5 Ativação Oocitária

De acordo com Fissore *et al.* (2002), na maioria dos mamíferos, os oócitos são ovulados na fase de metáfase da meiose II (MII). Antes de alcançarem a MII, os oócitos sofrem uma maturação nuclear e citoplasmática, progredindo do estágio G2/M da primeira meiose para MII. Durante esse processo de maturação, os oócitos sofrem uma reorganização e uma redistribuição significativa de suas organelas, adquirindo um complemento de moléculas sinalizadoras. Todo esse conjunto de mudanças torna o oócito competente para completar a meiose quando fecundado, permitindo o desenvolvimento embrionário.

Algumas das mudanças que ocorrem no oócito, causadas pela fecundação, além da resolução da segunda meiose, são a exocitose de grânulos corticais, a extrusão do segundo corpúsculo polar e a formação do pró-núcleo. Coletivamente, todos esses eventos são referidos como ativação oocitária. A penetração do espermatozoide no oócito é o estímulo necessário para que ocorra o início da ativação, caracterizado por um aumento na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$), com tais aumentos sendo repetitivos e comumente referidos como oscilações. A molécula responsável por essas oscilações é a fosfolipase C zeta (PLC ζ). Essa molécula é responsável pela formação de diacilglicerol (DG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), a partir da hidrólise de fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PIP2). Ambas as moléculas formadas têm um poderoso potencial sinalizador, mas a provável responsável pela liberação de cálcio das reservas intracelulares (principalmente do retículo

endoplasmático, ER) é a IP₃, tanto em células somáticas como durante a fecundação. A necessidade dessas oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ está associada com a capacidade desse evento em reativar a meiose II, iniciando-se a anáfase e posteriormente o desenvolvimento embrionário. Para tal, as oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ ativam o complexo promotor de anáfase/ciclossoma (APC/C) e a consequente inativação do fator de promoção da maturação (MPF; WAKAI; ITO; FISSORE, 2014).

Conhecendo a fisiologia da ativação oocitária, criaram-se protocolos para a ativação artificial dos gametas, já que na clonagem, não ocorre a fecundação do oócito pelo espermatozoide. Esses protocolos são elaborados para mimetizar a sequência de oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ (WAKAI, ITO; FISSORE, 2014).

Um método comum de ativação oocitária *in vitro* baseia-se na exposição dos gametas ao etanol ou a ionóforos de Ca^{2+} , como o A23187 e a ionomicina (IO). Ambos os compostos são responsáveis por um aumento único e sustentado da $[Ca^{2+}]_i$, sendo este sinal o suficiente para induzir o início da ativação oocitária. Além desses, são adicionados ao meio, para que ajam por várias horas após a exposição aos ionóforos, um inibidor da síntese de proteínas, como a ciclohexamida (CHX) e/ou um inibidor de quinases, como a dimetilaminopurina (6-DMAP). A alta atividade do MPF poderá induzir a condensação da cromatina, a estabilização do fuso meiótico e conseqüentemente, a manutenção dos oócitos em MII. Esses compostos (CHX e 6-DMAP) são adicionados ao meio de ativação a fim de aumentar a $[Ca^{2+}]_i$, garantindo assim, a degradação do MPF. A ativação também pode ser feita por meio de pulsos elétricos, e nessa técnica, também se recomenda a utilização dos inibidores proteicos. A técnica de utilizar fusão e ativação simultâneas pode ser realizada utilizando a eletroporação, fazendo com que o(s) pulso(s) da corrente contínua induza(m) a fusão das membranas e sirva(m) como estímulo inicial para a ativação oocitária. Apesar disso, o meio de fusão geralmente contém baixas quantidades de cálcio, o que pode não ser efetivo na degradação do MPF (BORDIGNON, 2017; WAKAI, ITO; FISSORE, 2014).

A ativação oocitária é um passo fundamental para que a clonagem seja eficiente. Falhas nesse processo de ativação podem causar um comprometimento na integridade da cromatina, interações nucleocitoplasmáticas anormais e o impedimento do desenvolvimento embrionário (BORDIGNON, 2017).

2.3.6 Cultivo dos Embriões

Após a fusão e a ativação, os embriões reconstruídos são colocados no cultivo *in vitro* (CIV). Para o CIV dispõe-se de uma variedade de sistemas de cultivo, os quais são rotineiramente utilizados para o desenvolvimento *in vitro* (FIV) dos embriões (HEYMAN, 2005; WELLS, 2005).

Vajta e Gjerris (2006) ressaltam que, considerando o delicado processo de fecundação e início do desenvolvimento embrionário, é praticamente um milagre que a técnica de transferência nuclear, com a introdução relativamente drástica de uma célula somática, resulte em embriões, fetos e produtos viáveis. Este fato revela a flexibilidade da natureza, que é capaz de compensar danos causados pelas diferentes etapas da clonagem.

De acordo com Gardner e Lane (2014) os sistemas de cultivo utilizados são eficazes devido ao seu desenvolvimento ter sido baseado na fisiologia e no metabolismo dos embriões. Mas por outro lado, curiosamente, as condições de cultivo estabelecidas para os embriões derivados da FIV não parecem ser tão eficazes para o desenvolvimento de embriões clonados. Os autores destacam que a pesquisa se mostra mais concentrada em entender a expressão gênica dos clones, dando menor atenção a sua fisiologia. Desta forma, durante a fase de CIV, tem-se pouca informação sobre nutrição e atividade metabólica de embriões clonados. Embriões derivados da clonagem por TNCS têm seu conjunto de proteínas (proteoma) diferente dos embriões provindos da fecundação *in vivo*, devido ao fato de que o núcleo da célula somática tem a capacidade de transcrever genes que normalmente não estão ativos nos blastômeros de embriões em fases iniciais de desenvolvimento. Essas mudanças no proteoma são as prováveis responsáveis pelo metabolismo alterado dos embriões clonados, e consequentemente, pela exigência de diferentes requisitos para cultivo.

Para um adequado desenvolvimento embrionário no CIV, deve-se suplementar o meio com componentes que auxiliem esse crescimento celular, mas estes suplementos não devem ser empregados por um período prolongado, já que isso pode afetar negativamente a qualidade dos embriões. Alguns dos componentes que são essenciais para o meio de cultivo são, por exemplo, soro fetal bovino, BSA, fatores de crescimento e vitaminas (PEREIRA; FREITAS, 2009).

Embriões produzidos *in vitro* são sensíveis às condições ambientais, as quais podem afetar a morfologia, a expressão gênica, o desenvolvimento embrionário e também a sobrevivência após o nascimento dos indivíduos clonados. Em modelos experimentais, como os empregados em suínos e roedores, há um efeito reduzido do ambiente *in vitro* sobre o

desenvolvimento dos embriões, pois estes são transferidos para a tuba uterina das fêmeas logo após a fusão das estruturas celulares. Já em outras espécies domésticas, como por exemplo em bovinos, usualmente a transferência dá-se apenas no estágio de blastocisto, o que permite uma maior exposição dos embriões ao ambiente *in vitro* (CAMPBELL *et al.*, 2007).

Tibary, Anouassi e Khatir (2005) relatam que existem diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para espécies ruminantes. Embriões em estádios iniciais de desenvolvimento têm sido cultivados com sucesso em meios com co-cultivo de células da granulosa, de células do *cumulus* e de células do oviduto, e também utilizando o meio líquido sintético de oviduto modificado (SOFm).

O CIV pode ser feito em placas com gotas de meio, colocando um embrião em cada gota ou em micropoços pelo sistema WOW. Em ambos os casos, o meio é coberto por óleo mineral, e mantido em incubadora a 38,5°C, sob atmosfera de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. Estes embriões permanecem no CIV até a transferência para a fêmea receptora, que é variável de uma espécie para a outra (CHOI *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2008).

Devido aos efeitos adversos encontrados nos embriões clones, que ainda podem apresentar uma relação com a regulação epigenética, há uma necessidade imediata de se intensificarem as pesquisas sobre a função metabólica dos embriões (GARDNER; LANE, 2014).

2.3.7 Transferência Embrionária (TE)

Os embriões devem alcançar um estágio de desenvolvimento adequado, usualmente dependente da espécie com que se trabalha para então serem transferidos para as fêmeas receptoras, as quais se encontram com o ciclo estral sincronizado para receber o embrião. Em suínos, os embriões são transferidos cirurgicamente no estágio de uma célula, em virtude das reduzidas taxas de desenvolvimento *in vitro*. Em bovinos, os embriões são transferidos via transcervical (inovulação) no estágio de blastocisto (com aproximadamente 120 células), no sétimo dia de cultivo após a ativação, pois nesta espécie o desenvolvimento embrionário *in vitro* é relativamente eficiente (VAJTA; GJERRIS, 2006). Na espécie caprina, os embriões são cultivados até o estágio de quatro células (por 35 h), e são transferidos cirurgicamente, em média de cinco embriões para a tuba uterina da receptora. Em ovinos e também em caprinos, pode-se realizar a transferência por um método semi-cirúrgico, que consiste na realização de laparoscopia com uma pequena incisão, sem a necessidade de anestesia geral (CHOI *et al.*,

2002; FELTRIN *et al.*, 2017; HEYMAN, 2005; PEREIRA; FREITAS, 2009; WELLS, 2005).

2.4 Gestação e Cuidados Neonatais dos Indivíduos Clonados

Desde o nascimento da ovelha Dolly em 1996, o uso de clonagem por TNCS tem sido aplicado com sucesso, proporcionando o nascimento de produtos viáveis, de diferentes espécies domésticas e selvagens. Apesar disso, o uso da clonagem na produção animal tem sido dificultado por perdas fetais e pós-natais, além de uma preocupação pública generalizada com a integridade e o bem-estar animal. Independente da espécie ou da técnica de clonagem utilizada, a sobrevivência fetal destes indivíduos   baixa, sendo que a porcentagem de descendentes nascidos vivos, sobre o número de embriões transferidos atinge, na espécie bovina, percentuais de 6 a 15%, e em suínos, de aproximadamente 6%. Alguns dos fatores que podem influenciar essa taxa de sucesso são dependentes do genótipo da célula doadora de núcleo e do tipo celular usado (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014).

Pode-se notar que os danos cumulativos sofridos pelos embriões após todas as etapas da clonagem por TNCS são capazes de reduzir o potencial de desenvolvimento dos embriões, podendo ainda causar a morte embrionária ou fetal em qualquer fase de desenvolvimento (DOMINKO *et al.*, 1999). Um dos principais pontos que afetam a viabilidade é a ativação dos embriões reconstruídos, em que caso haja mudanç as, mesmo que pequenas, a forma de ativação pode influenciar negativamente no desenvolvimento embrionário (VAJTA; GJERRIS, 2006). Além disso, as habilidades técnicas do operador são determinantes na taxa de sucesso da clonagem, podendo ser um fator de variação a velocidade da manipulação dos embriões (PERRY; WAKAYAMA, 2002; WAKAYAMA; CIBELLI; WAKAYAMA, 2003; YANAGIMACHI, 2002).

2.4.1 Escolha das Fêmeas Receptoras

Durante a escolha das receptoras, diferentes aspectos devem ser considerados, dando-se atenção particular ao estado sanitário e a habilidade em parir, preferindo-se multíparas, pois usualmente os clones apresentam sobrepeso ao nascimento. O estado reprodutivo e a condição corporal também devem ser avaliados nessas fêmeas, sendo que o escore ideal é 3,0 a 3,5 (em uma escala de 1 a 5; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; PANARACE *et al.*, 2007).

Na espécie bovina, tanto vacas quanto novilhas apresentam bons resultados como receptoras de embriões clones. A principal vantagem de se utilizar novilhas virgens e híginas é a maior eficiência em alcançar a prenhez através da TE, todavia, novilhas são mais susceptíveis a apresentarem distocias. Já as vacas (múltiplas) tendem a ter bezerros mais pesados, principalmente após o quarto ou quinto parto, por isso, deve-se evitar utilizar vacas mais velhas como receptoras. As fêmeas que não ficarem prenhes após duas tentativas consecutivas de transferência devem ser descartadas dessa função. Dependendo do cenário de custos, o número de retornos ao estro tolerados pode variar (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014).

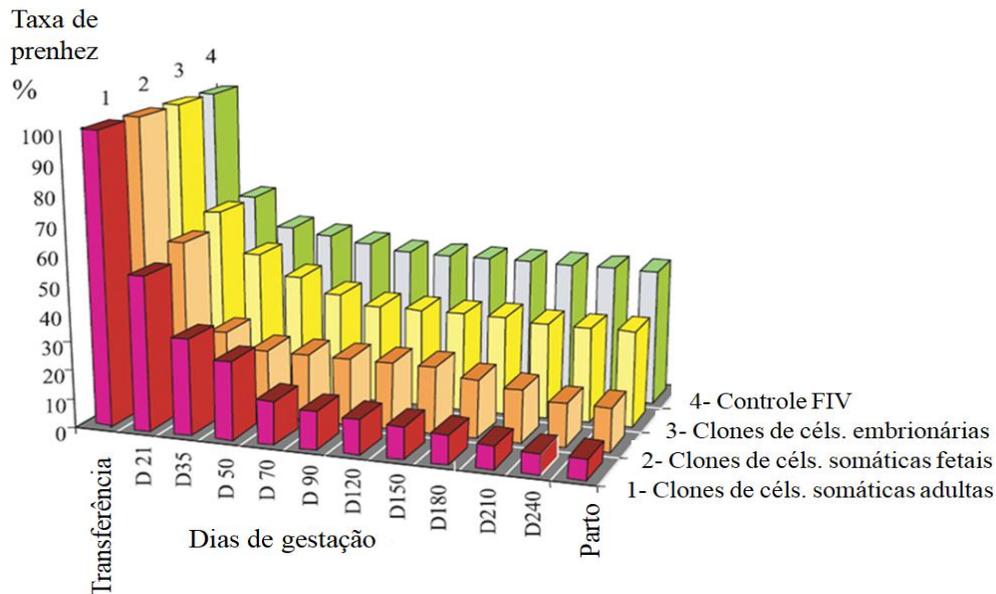
2.4.2 Monitoramento e Perdas Gestacionais

Duas semanas após a TE deve-se observar o retorno ao estro das receptoras. Entre os dias 30-35 de gestação, é realizada a primeira avaliação por ultrassonografia, determinando o tamanho do embrião e viabilidade, pela presença de batimentos cardíacos (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014). A taxa de prenhez aos 30 dias pode chegar a 50%, independente de terem sido transferidos um ou mais embriões por receptora (HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002). Em geral, o método de avaliação gestacional mais utilizado durante a prenhez é a ultrassonografia, já que a partir dela, pode-se avaliar a viabilidade e o tamanho do feto, monitorando também características ligadas à placenta, como por exemplo, a dimensão dos placentônios (HEYMAN, 2005). Além da ultrassonografia, outros métodos podem ser utilizados para avaliação da prenhez, como por exemplo, o desenvolvimento placentário a partir da determinação de proteínas séricas, como a proteína B gestacional específica (PSPB), a glicoproteína associada à gestação (PAG) e a proteína sérica gestacional 60 (PSP60; HEYMAN *et al.*, 2002).

Heyman (2005) fez uma avaliação da evolução da gestação em bovinos (Figura 7), avaliando diferentes grupos gestacionais. As fêmeas receptoras foram divididas em quatro grupos, e cada um dos grupos recebeu embriões de diferentes origens: I. clones derivados de células somáticas de animais adultos; II. clones derivados de células somáticas fetais; III. clones derivados de células embrionárias; e IV. embriões produzidos por FIV (controle). Os dados mostram que as taxas de prenhez iniciais são muito similares entre os quatro grupos, porém, a frequência de perdas embrionárias e fetais até os dois meses de gestação foi duas vezes maior nas fêmeas que receberam embriões clones derivados de células somáticas (adultas e fetais; HEYMAN *et al.*, 2002) do que a frequência observada no grupo que recebeu

embriões clones de células embrionárias e de FIV. Heyman (2005) destaca que estas perdas precoces estão frequentemente associadas a deficiências que podem ocorrer no início do processo de placentação, caracterizadas por uma vascularização anormal do tecido extra-embriônico e pelo número reduzido de placentônios.

Figura 7. Avaliação da evolução da prenhez de receptoras bovinas, mostrando a taxa de prenhez em diferentes períodos da gestação, comparando os quatro grupos de gestantes.



Fonte: adaptado de Heyman (2005, p. 357).

Prenhez de embriões clones são frequentemente caracterizadas como de alto risco e podem ser identificadas por diferentes procedimentos veterinários: exame externo, observações clínicas, avaliação ultrassonográfica e testes clínicos. Exemplos das anormalidades que podem ser identificadas são: edema de placenta e placentônios, aumento de líquido alantoide (hidralantoide), corpos cetônicos, aumento da concentração de PSP60, aumento da circunferência abdominal, alteração no tamanho do fígado do feto e do cordão umbilical e mudanças na ecodensidade fetal. Para a avaliação da saúde da fêmea receptora, alguns dos parâmetros avaliados são: peso corporal, ingestão alimentar, circunferência abdominal, temperatura corporal e as taxas cardíaca e respiratória (HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002; PANARACE *et al.*, 2007).

2.4.3 Parto

Os bezerros produzidos a partir da clonagem por TNCS geralmente apresentam tamanho e peso superiores aos médios observados para a espécie. Com o objetivo de se assegurar o bem-estar das fêmeas no parto, recomenda-se induzi-lo e, em sendo necessário, retira-se o bezerro por cesariana. A indução ao parto é frequente em prenhez de clones, e isto se deve ao fato das receptoras frequentemente não apresentarem sinais evidentes de preparação para a parição, além do que, a indução assegurará que quando o parto ocorrer, a fêmea terá a melhor assistência possível. Por isso, é comum observar que muitas gestações de clones se prolonguem, indo além da data de parto prevista, o que sugere que clones necessitam de um maior tempo *in utero* para adequada maturação; por outro lado, gestações prolongadas são associadas ao maior peso dos indivíduos ao nascer, aumentando os riscos da ocorrência de distocia (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002).

Quanto à indução ao parto, diferentes protocolos podem ser aplicados:

- Injeção única intramuscular (IM) de 25 mg de dexametasona de longa duração no dia 270 de gestação para induzir o parto (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014);
- Injeção única de dexametasona ou de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) para indução da maturação pulmonar final do feto, antes da realização da cesariana (HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002);
- Injeções de 30 mg de dexametasona e 2 mL de $PGF_{2\alpha}$, IM, 3-5 dias após completos 282 dias de gestação para induzir o parto (PANARACE *et al.*, 2007);
- Injeção IM de 20 mg de dexametasona, 36 h antes da cesariana, quando o parto ainda não ocorreu no dia 282 de gestação (HEYMAN *et al.*, 2002).

Após as cuidadosas avaliações clínica e obstétrica, muitos médicos veterinários optam pela realização da cesariana eletiva, principalmente devido ao tamanho maior dos bezerros clones, e também à ocorrência de possíveis contraturas em articulações, que em ambos os casos, dificultam a passagem dos bezerros pelo canal do parto (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014).

Segundo Panarace *et al.* (2007), pode-se classificar o nível de assistência ao parto de acordo com o tipo de intervenção necessária: 1. parto natural: parição sem nenhuma

assistência; 2. parto assistido: tração humana para retirada do bezerro do canal do parto; 3. cesariana: cirurgia para retirada do bezerro, sendo essa a última opção.

2.4.4 Cuidados Pós-Natais com o Neonato

Imediatamente após o parto é realizado o grampeamento do umbigo dos clones. Esse procedimento é indicado devido aos animais apresentarem cordões umbilicais particularmente grandes, já que as artérias e as veias que o compõe podem não ser constrictas ao nascimento, gerando riscos de hemorragias, além de aumentar a frequência de infecções umbilicais ascendentes. Suturar a extremidade do umbigo e realizar a adequada desinfecção reduz as chances da ocorrência de infecções na semana pós-parto (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002; PANARACE *et al.*, 2007).

Bezerros clones geralmente são menos vigorosos ao nascer, e caso não recebam uma assistência adequada, as chances de manterem-se vivos são reduzidas. Isso significa manter os animais sob cuidados intensivos desde o nascimento, procurando-se evitar a ocorrência de hipóxia e/ou acidose nas primeiras horas de vida (HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002).

A administração de colostro também é importante. Muitas vezes, os clones nascem com baixos reflexos de sucção, o que pode ser resolvido com a administração do colostro via oral ou por sonda. Se a fêmea que gestou este bezerro apresentar um colostro de boa qualidade, este deve ser administrado ao animal; caso a qualidade seja baixa, deve-se substituir o colostro materno e utilizar um de qualidade certificada, fornecido por uma instituição (banco de colostro). Em 24 h, o bezerro deve ter consumido aproximadamente 10% do seu peso corporal em colostro. Se em 60 h após o parto o bezerro ainda não adquiriu o reflexo de sucção, a nutrição pode ser feita via cateter endovenoso na veia jugular (administração de dextrose, alternando com solução salina), até que o clone consiga se alimentar sozinho (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; PANARACE *et al.*, 2007).

Segundo Hill e Chavatte-Palmer (2002), em geral, os animais clonados que progridem bem durante o período neonatal inicial, apresentam boa chance de sobrevivência.

2.5 Anomalias do Desenvolvimento dos Clones

Vários estudos evidenciam que os clones são iguais aos doadores de células (não-clones) em aspectos como o comportamento, as taxas de crescimento, a reprodução, as características produtivas e a expectativa de vida, apresentando um metabolismo estável e

funcional após o nascimento. Além disso, a progênie desses clones também parece ser normal. Por outro lado, existem indivíduos produzidos pela clonagem que apresentam desenvolvimento anormal (WELLS, 2005).

Segundo Vajta e Gjerris (2006) e Bordignon (2017), anomalias diagnosticadas em indivíduos produzidos pela clonagem por TNCS podem ser causadas por diferentes fatores (multifatorial), dentre os quais estão:

- Células doadoras de núcleo e/ou oócitos inapropriados ou de baixa qualidade;
- Sincronia inapropriada entre a fase do ciclo celular em que a célula doadora de núcleo se encontra, e a fase em que está o oócito;
- Reprogramação inadequada do genoma da célula doadora, levando à expressão gênica anormal durante o desenvolvimento;
- Manipulação errônea ou pouco cuidadosa, podendo causar às estruturas danos mecânicos, osmóticos, elétricos, tóxicos, térmicos e outros;
- Fêmeas receptoras inadequadas;
- Condições técnicas deficientes que envolvem a maturação oocitária, o cultivo celular, a ativação oocitária e o CIV dos embriões.

Em casos em que a reprogramação gênica esteja aparentemente incompleta, ou seja, que fatores epigenéticos não reprogramem o núcleo da célula doadora para um estado semelhante ao de um zigoto, podem ocorrer desvios na expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário subsequente. Alguns dos padrões inadequados que se originam da reprogramação epigenética errônea são relacionados com a metilação do DNA, o remodelamento anormal ou incompleto da cromatina, a inativação do cromossomo X, e a expressão de genes que sofreram ou não *imprinting* genômico (AGUIAR *et al.*, 2017; WELLS, 2005).

Ao que tudo indica, as patologias associadas aos clones produzidos a partir de células somáticas, tanto no período pré quanto no pós-natal, são de origem epigenética, não sendo transmitidas para a progênie desses clones (BERTOLINI, 2009; HEYMAN, 2005).

Algumas das anormalidades observadas após a TE, que são consequência da reprogramação gênica incompleta, incluem baixas taxas de prenhez, altas perdas gestacionais em períodos iniciais e tardios, natimortalidade, dificuldades no parto, mortalidade neonatal, malformações, altas taxas de mortalidade pós-natal, fenótipos específicos associados à clonagem durante a fase adulta, e outros (VAJTA; GJERRIS, 2006; WELLS, 2005).

A Tabela 2 relaciona alguns dos principais problemas clínicos observados em animais clonados em diferentes espécies.

Tabela 2. Problemas clínicos mais comuns observados em animais clonados, em diferentes espécies.

Espécie	% aproximada de clones saudáveis ao nascimento	Principais problemas observados em clones e placentas
Bovinos	≥ 60	Malformações placentárias, aumento do peso ao nascer, hipertensão, malformações cardíacas, anemia, imunodeficiências, diabetes, fibrose hepática, deficiências e infecções respiratórias, hipóxia, desenvolvimento renal anormal
Suínos	≥ 90	Problemas placentários, menor peso ao nascer, membros contraídos, gestação prolongada
Caprinos	≥ 80	Infecções respiratórias
Ovinos	≥ 40	Malformações placentárias, aumento do peso ao nascer, hipertrofia cardíaca, hipertensão, fígado aumentado, fibrose hepática, problemas respiratórios, hipóxia
Equinos	≥ 80	Septicemia, malformação placentária
Felinos	≥ 60	Natimortalidade, problemas respiratórios, septicemia
Murinos	≥ 90	Placenta aumentada, aumento do peso ao nascer, hérnia umbilical, problemas respiratórios, necrose hepática, imunodeficiência, obesidade precoce

Adaptado de Baldassarre *et al.*, 2004; Beaujean *et al.*, 2005; Bordignon, 2017; Cibelli *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2008; Gómez; Pope; Dresser, 2006; Kurome *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Palmieri *et al.*, 2008; Panarace *et al.*, 2007; Rhind *et al.*, 2003; Thuan; Kishigami; Wakayama, 2010; Vajta; Zhang; Macháty, 2007; Vanderwall *et al.*, 2006; Wilmut *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015.

2.5.1 Problemas Pré-Natais em Clones

Problemas associados com biotécnicas avançadas da reprodução estão relacionados não apenas com a clonagem, mas também com a produção *in vitro* (PIV) de embriões a partir da FIV. Algumas das anormalidades gestacionais observadas incluem o aumento na mortalidade embrionária, abortos, duração da gestação atípica, anormalidades placentárias, hidropsia das membranas fetais, entre outras (BERTOLINI *et al.*, 2007; CONSTANT *et al.*, 2006; HILL, CHAVATTE-PALMER, 2002). Segundo Bordignon (2017), a maioria das perdas embrionárias ou fetais ocorre no terço inicial da gestação, mas pode ocorrer em qualquer período.

2.5.1.1 Anormalidades Placentárias

Uma característica comum observada na gestação de animais produzidos pelas técnicas de clonagem é que a placenta apresenta uma falha em seu desenvolvimento e não funciona corretamente (WELLS, 2005). Isso geralmente leva à morte fetal tardia, devido às anormalidades placentárias causarem hidropsia severa e crescimento exagerado do feto; tais defeitos são referidos como Síndrome da Cria Anormal (em inglês, *Abnormal Offspring Syndrome* - AOS), sendo que tal evento não ocorre somente em animais produzidos pela clonagem por TNCS. Esse tipo de anormalidade é associado, entre outros fatores, a problemas com a expressão anormal de genes que sofreram *imprinting*, sendo que estes, geralmente estão envolvidos no controle da formação e das funções placentárias (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; CONSTANT *et al.*, 2006; TSUNODA; KATO, 2002).

Farin, Piedrahita e Farin (2006) classificaram a AOS em quatro tipos diferentes. No tipo I, o desenvolvimento da síndrome é no início da gestação, causando morte embrionária ou aborto; no tipo II, ocorre um desenvolvimento anormal das membranas placentárias e do feto, e essa falha em manter a unidade feto-placentária resulta em aborto; o tipo III ocorre no fim da gestação, e as anormalidades do feto e da placenta não conseguem ser compensadas, gerando neonatos muito comprometidos e que não têm chances de sobreviver; o tipo IV também ocorre no final da gestação, mas nesse caso, as anomalias são mais moderadas, o que permite uma compensação pela unidade feto-placentária, gerando neonatos viáveis, mas que podem apresentar anomalias clínicas, hematológicas ou bioquímicas. Segundo Farin, Farmer e Farin (2010), o tipo de AOS associada com animais produzidos a partir da clonagem por TNCS é predominantemente do tipo II, já que a maioria das gestações é perdida entre 40 e 90 dias, principalmente devido ao desenvolvimento anormal da placenta.

Vajta e Gjerris (2006) destacam que em bovinos, ovinos e murinos, a síndrome pode apresentar-se de diferentes formas, tais como:

- Anormalidades placentárias;
- Crescimento fetal extremo e gestação prolongada;
- Natimortalidade, hipóxia, falhas respiratórias e problemas circulatórios, que podem diminuir a viabilidade pós-natal;
- Aumento da temperatura corporal ao nascer;
- Malformações no trato urogenital, no fígado e no cérebro;
- Disfunções imunes, hipoplasia linfóide, anemia e atrofia do timo;

- Infecções bacterianas e virais.

Observa-se que geralmente a placenta da gestação de animais clones (ruminantes) apresenta uma redução do número total de placentônios, podendo ser de 50% a 80% menor do que a quantidade encontrada em placentas de animais produzidos por inseminação artificial (IA) ou monta natural. Essa redução em quantidade causa um aumento compensatório no tamanho dessas estruturas e também os deixa edemaciados. Tal anomalia pode levar à morte do feto por insuficiência placentária, devido ao contato materno-fetal inadequado, e conseqüentemente, a transmissão deficiente de nutrientes (BECKETT *et al.*, 2014; HILLS; CHAVATTE-PALMER, 2002; TICIANI *et al.*, 2020; WELLS, 2005). Outras irregularidades observadas nas placentas incluem o tamanho irregular, uma vascularização reduzida e hidroalantoide (distensão abdominal grosseiramente anormal). A hidroalantoide em bovinos, por exemplo, ocorre em 0,02-0,07% das prenhez por IA ou por monta natural e em 5% das prenhez derivadas da PIV; já naquelas derivadas da clonagem, o percentual é bem maior, atingindo em média de 25-27% das vacas prenhez aos 120 dias (CONSTANT *et al.*, 2006; HEYMAN *et al.*, 2002; OBACK; WELLS, 2003; WELLS, 2005). Quando essas anormalidades placentárias não acarretam em morte fetal, os animais clones comumente apresentam baixa viabilidade como recém-nascidos (BORDIGNON, 2017). Na ocorrência de hidropsia das membranas fetais, geralmente, os casos são suficientemente graves para levar ao comprometimento fetal, dando origem a produtos não viáveis. Geralmente, essa anomalia é diagnosticada a partir dos cinco meses de gestação, podendo ocorrer até próximo ao parto. Considerando o alto risco de mortalidade e o bem-estar das fêmeas receptoras, o mais usual é que se encerre a gestação assim que a hidropsia for detectada. Nos casos em que a hidroalantoide se manifestar de uma a duas semanas antes do parto, ao invés de provocar o aborto, recomenda-se realizar cesariana de emergência (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; WELLS, 2005).

O principal recurso para monitorar a viabilidade fetal e a presença de anormalidades placentárias, como o aumento de volume do líquido alantoide e a presença de placentônios aumentados e edemaciados, é a ultrassonografia, geralmente transabdominal (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; HILL; CHAVATTE-PALMER, 2002). A ultrassonografia é considerada um procedimento importante e não-invasivo de avaliação, que pode ser utilizado como previsor de perdas gestacionais (PANARACE *et al.*, 2007).

2.5.1.1 Crescimento Anormal

Outra anomalia que ocorre durante a gestação de animais clones é o desenvolvimento de animais de tamanho anormal, geralmente maiores do que o normal. Esse tipo de ocorrência também está relacionado com a alteração da expressão de genes de caráter de *imprinting* (BORDIGNON, 2017; THIBAUT, 2003). Em ovinos, por exemplo, alterações na expressão do gene IGF2R, que regula um fator de crescimento fetal, causam um aumento dos níveis desse hormônio, e conseqüentemente, os fetos desenvolvem AOS, e os cordeiros nascem com peso elevado (YOUNG *et al.*, 2001). Nas espécies bovina e ovina, esse acontecimento é mais comum do que em outras espécies, sendo que os produtos podem ser 25% mais pesados do que o normal. Em suínos, por exemplo, o que acontece é o contrário, já que leitões clones geralmente são menores do que os demais (FARIN; FARMER; FARIN, 2010; WELLS, 2005). Esse aumento de peso ao nascer, associado com o período prolongado da gestação de clones, geralmente exige que haja intervenção nos partos, já que esse aumento de tamanho pode causar complicações mecânicas durante a parição (WELLS, 2005).

2.5.2 Problemas Clínicos Pós-Natais em Clones

A ocorrência de mortalidade pós-natal é geralmente registrada entre a primeira semana e o quarto mês de vida. Entre os bezerros nascidos viáveis, apenas 50-70% apresentam um desenvolvimento normal até a fase adulta. Dentre os problemas que podem acometer esses clones, observam-se infecções de rúmen e abomaso, coccidioses e também infecções pós-traumas (BATCHELDER *et al.*, 2007; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004; PEREIRA; FREITAS, 2009).

Dependendo das condições de manejo, os clones nascidos podem enfrentar uma grande variedade de patógenos presentes no ambiente, os quais poderão causar septicemia e doenças gastrointestinais e respiratórias. Além dos riscos infecciosos, os clones ainda estão sujeitos a apresentar doenças relacionadas com o processo de clonagem, como a aplasia de células sanguíneas e doenças cardíacas (HILL; CHAVATTE-PALMER; 2002).

Algumas das anomalias observadas em animais clones que nasceram vivos incluem a debilitação, estresse respiratório, hipóxia, sintomas respiratórios (taquipneia ou bradipneia), hipoglicemia, hiper ou hipotermia, cordão umbilical grande, permanência do úraco, defeitos cardíacos (hipertensão pulmonar persistente, murmúrios cardíacos, taquicardia, ventrículo esquerdo aumentado), hipoplasia linfóide, anemia, congestão e fibrose hepática, problemas

renais (hidronefrose em ovinos), ascite, tendões flexores contraídos, defeitos articulares, malformações de órgãos, e falhas multissistêmicas (BATCHELDER *et al.*, 2017; BORDIGNON, 2017; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014; WELLS, 2005). Outras afecções e em diferentes espécies e sistemas podem ser visualizadas nas Tabelas 2 e 3.

Durante os dias iniciais após o nascimento, recomenda-se que um médico veterinário experiente acompanhe o neonato, já que não se sabe quais são os desafios clínicos que o clone poderá desenvolver. A glicemia, a postura e a temperatura corporal devem ser regularmente verificadas e corrigidas caso estejam anormais (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2014). Os clones neonatos que sobrevivem geralmente apresentam metabolismo e fisiologia neonatais alterados, provavelmente devido às anormalidades placentárias, e para que esses parâmetros se ajustem à anormalidade, é necessário tempo (WELLS, 2005).

A Tabela 3 apresenta os sistemas corporais em que já se observaram acometimentos em clones neonatos.

Tabela 3. Sistemas corporais em que anormalidades foram observadas em clones neonatos.

Sistema	Anormalidades
Respiratório	Deficiência de surfactante, aspiração de mecônio, pneumonia
Cardiovascular	Hipertensão pulmonar, umbigo aumentado, septicemia
Hematopoiético	Imunodeficiência, anemia
Metabólico	Hipoglicemia, diabetes, obesidade, hipertermia idiopática
Gastrointestinal	Gastrite, enterite
Musculoesquelético	Contração de tendões, aumento de tamanho corporal, artrite infecciosa
Reprodutor	Hidroalantose e/ou edema, número de placentônios reduzido, placentônios aumentados, placenta com peso elevado
Endócrino	Sinais de parição atrasados ou ausentes, baixa produção de leite pós-natal, leptina elevada
Urinário	Hidronefrose (comum em cordeiros)

Fonte: Hill e Chavatte-Palmer (2002).

Pereira *et al.* (2020), realizaram a análise macroscópica e histopatológica de 41 clones bovinos que morreram no período neonatal. As principais lesões macroscópicas observadas foram:

- Fígado: aumento, congestão e coloração amarelada;
- Rins: coloração amarronzada e presença de cistos;
- Pulmões: atelectasia, consolidação do parênquima e secreções nos brônquios e bronquíolos;

- Coração: hipertrofia concêntrica e excêntrica, cistos hemáticos e persistência do ducto arterioso.

Apesar de todas essas alterações possíveis de acontecerem, a maioria dos animais clonados nascidos vivos devem apresentar desempenho de crescimento normal, e habilidades produtivas e reprodutivas semelhantes às dos demais animais da espécie (WELLS, 2005). Uma exceção a isso são os camundongos (*Mus musculus domesticus*), sobre os quais já existem estudos que relatam a menor expectativa de vida em animais clones em relação aos demais, indicando que camundongos clones podem ter uma vida até 50% mais curta (OGONUKI *et al.*, 2002; TAMASHIRO *et al.*, 2002).

2.6 Aplicabilidade da Clonagem Animal

A clonagem animal é uma técnica que pode ser utilizada em diferentes áreas. A maioria das aplicações é voltada para pesquisa e para o entendimento de processos biológicos, principalmente relacionados ao DNA. Apesar disso, existem aplicações que não são voltadas para pesquisa, tendo um cunho mais prático. Destas pode-se citar: xenotransplantes (reposição de órgãos e tecidos defeituosos entre diferentes espécies animais), produção de animais transgênicos que produzam produtos farmacológicos (biorreatores), replicação de animais (reposição de animais de companhia, multiplicação de animais com bom desempenho atlético e replicação de animais de fazenda com bons índices produtivos), preservação e disseminação de genéticas de valor, preservação de espécies ameaçadas de extinção, terapias celulares, entre outras (SEIDEL Jr., 2014; SIMMET; WOLF; ZAKHARTCHENKO, 2021; WELLS, 2005).

2.6.1 Replicação de Animais de Produção

A utilização da clonagem em animais de produção está principalmente relacionada à multiplicação de animais com fenótipo e/ou genótipo desejáveis, considerados animais de elite. Algumas das características produtivas que são valorizadas nesta escolha são: alta produção de leite, leite com maior porcentagem de proteína, eficiência alimentar superior, taxa de crescimento elevada, características especiais da carne (maciez, marmoreio) e resistência a doenças, sendo estas economicamente importantes na produção de alimentos de origem animal (BORDIGNON, 2017; PAGE; AMBADY, 2004).

Apesar de a clonagem ter o potencial de auxiliar a multiplicação de tais características desejáveis, a técnica ainda é pouco eficiente, o que dificulta a multiplicação desses animais

em larga escala. Apesar disso, pode-se investir na produção de poucos animais geneticamente superiores para serem utilizados na reprodução, transmitindo assim seus genes para a progênie (WELLS, 2005). Bordignon (2017) relata que apesar da baixa eficiência da técnica, diferentes espécies animais foram produzidas nos últimos vinte anos, incluindo bovinos, suínos, caprinos, ovinos, bubalinos e equinos, sendo bovinos e suínos as espécies com o maior número de clones produzidos. Outro benefício é que a maioria dos clones tem crescimento, produção e reprodução normais, o que é um aspecto positivo a se considerar quando se quer utilizar esses animais para a reprodução. Os produtos derivados desses clones também se mostram com propriedades biológicas e bioquímicas iguais às de animais não-clones da mesma espécie.

Em programas de seleção, a utilização de animais clones é mais cara e mais difícil, comparando com outras biotécnicas reprodutivas, porém apresenta maior eficiência do que a reprodução seletiva (IBTISHAM *et al.*, 2017). Além disso, a clonagem de animais de fazenda também pode estar relacionada à preservação e à disseminação de genomas de valor. Isso mostra que, a partir da produção *in vitro* de clones, e sua crioconservação, é possível que cópias de animais possam ser feitas em qualquer momento no futuro, como por exemplo, resgatar genomas indisponíveis em determinada população (PAGE; AMABDY, 2004).

2.6.2 Produção de Animais Transgênicos

A produção de animais transgênicos era realizada essencialmente pela microinjeção pronuclear de DNA em embriões. Essa técnica apresentava eficiência muito baixa, sendo que menos de 1% dos embriões microinjetados e transferidos chegavam a se tornar animais transgênicos. As principais causas para essa baixa eficiência eram a reduzida taxa de integração transgênica e a imprevisibilidade da regulação e da expressão do gene transferido. Após o sucesso que a clonagem por TNCS apresentou, viu-se a possibilidade de utilizar células geneticamente modificadas como doadoras de núcleo, produzindo embriões clones transgênicos. Essa técnica oferece maior vantagem para superar as limitações da primeira, já que as células somáticas podem ser cultivadas e transfectadas com os genes, e posteriormente, verificadas quanto à inserção e à expressão do transgene, antes de se realizar a transferência nuclear (WALL, 1996; WELLS, 2005; ZHANG; PIEDRAHITA, 2014).

A transgenia é alcançada através da intervenção de genes, sendo que o gene transferido é composto por uma parte funcional e um promotor para a sua expressão na célula hospedeira (GEORGE *et al.*, 2011). A clonagem auxilia na técnica, já que os clones são

derivados da doação de núcleo dessas células geneticamente modificadas. O primeiro experimento envolvendo essa técnica produziu três cordeiros a partir de fibroblastos fetais geneticamente modificados (SCHNIEKE *et al.*, 1997). O genoma dos cordeiros clonados foi modificado para que eles produzissem o fator IX de coagulação de humanos. Uma sequência promotora foi usada para a transferência nuclear, e a outra sequência, foi projetada para garantir que a expressão do gene funcionasse exatamente na glândula mamária das ovelhas adultas, e que o leite produzido, contivesse o fator IX de coagulação. Apenas um dos cordeiros sobreviveu, e quando se tornou uma ovelha adulta, a produção do fator de coagulação no leite concretizou-se (DI BERARDINO, 2001). Esse foi o primeiro experimento bem sucedido, e na sequência, outros animais transgênicos foram produzidos com sucesso (IBTISHAM *et al.*, 2017)

Dependendo dos genes introduzidos aos clones, existem diferentes usos possíveis para os animais geneticamente modificados, que podem ser utilizados na biomedicina ou na produção animal. Wells (2005) lista alguns exemplos:

- Proteínas humanas de uso farmacêutico (purificadas do leite de vacas);
- Órgãos de suínos para xenotransplante;
- Modelos para doenças de origem genética em humanos (como a fibrose cística);
- Diferentes aplicações na produção animal com objetivos de melhorar a qualidade ou a quantidade de alimentos de origem animal, reduzir a poluição ambiental e melhorar a resistência dos animais a doenças.

Com o aumento da eficiência na produção de animais transgênicos, pode-se imaginar que indústrias farmacêuticas consigam utilizar proteínas para o tratamento de disfunções em humanos, que podem ser produzidas por esses animais (IBTISHAM *et al.*, 2017).

Resultados positivos foram obtidos em várias espécies domésticas incluindo bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Nessas espécies, a maioria dos animais nascidos, de fato, expressou o gene transfetado e, além disso, foi capaz de transmitir esse gene para sua prole. Vários exemplos podem ser encontrados, os quais demonstram a eficiência da utilização da TNCS na produção de animais transgênicos. Alguns desses são: vacas transgênicas que expressam maiores níveis de proteínas (caseína) no leite, vacas transgênicas que expressam proteínas antibacterianas nas glândulas mamárias, suínos transgênicos que apresentam níveis elevados de ácidos graxos ômega-3 na carne, bovinos clonados que produzem anticorpos policlonais humanos (BORDIGNON, 2017; PAGE; AMBADY, 2004), cabras transgênicas que

produzem proteínas terapêuticas através do leite, como a lisozima (BEHBOODI *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2017), touros transgênicos que produzem crias apenas machos ou apenas fêmeas (FABER *et al.*, 2003), vacas com resistência à mastite (WALL *et al.*, 2005), suínos capazes de sintetizar a enzima fitase para digerir o fitato das plantas, diminuindo a eliminação de fósforo nas fezes e conseqüentemente, diminuindo a poluição ambiental (EnviropigTM; KUES; NIEMANN, 2004; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011), animais de fazenda capazes de ter crias resistentes a doenças devido à: expressão de anticorpos via leite materno, capacidade de desregular mecanismos virais, resistência a doenças causadas por príons, controle de parasitos (ovinos) e resistência à mastite (bovinos), além de outros (ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011). Essa tecnologia ainda pode ser utilizada para produção de animais de fazenda que apresentem características produtivas melhores, como o aumento da qualidade de carne e da lã, uniformidade de carcaça, maior eficiência alimentar e melhor imunidade. Essas modificações em potencial podem ser benéficas para os produtores de animais, para os consumidores e para o ambiente (PAGE; AMBADY, 2004).

2.6.3 Aplicações na Biomedicina

A possibilidade de utilizar a clonagem por TNCS para produção de animais transgênicos foi vista com interesse para utilização na biomedicina. Diferentes aplicações dentro desta área podem ser exploradas (BORDIGNON, 2017).

2.6.3.1 Terapias Celulares

Na Medicina Humana, algumas áreas podem utilizar a clonagem por TNCS, inclusive nas relacionadas à terapia celular. Essa clonagem terapêutica consiste em usar a TNCS para reprogramar células somáticas em tecidos indiferenciados, a partir de células-tronco pluripotentes. A aplicabilidade desses tecidos pode ser variada, dependendo de cada paciente. Alguns exemplos incluem o tratamento de doenças degenerativas, de injúrias por traumas, ou ainda para corrigir condições de predisposição genética. Essa técnica funciona especialmente em doenças em tecidos em que não há reparação e nem substituição tecidual de maneira eficiente (exemplos: diabetes tipo 1, distrofia muscular, traumas na medula espinhal, alguns tipos de câncer, desordens neurológicas, incluindo a doença de Parkinson). A vantagem em se utilizar células indiferenciadas é que elas se adaptam a cada caso específico, sem risco de haver rejeição pelo organismo do paciente. Apesar disso, a utilização desta biotecnologia em

humanos pode ser controversa em quesitos éticos, já que se utilizariam embriões e oócitos humanos para realização da técnica (BORDIGNON, 2017; GARDNER, 2002; GREEN, 2002; WELLS, 2005).

2.6.3.2 Produção de Biorreatores

Outra aplicação na área biomédica é a produção de biorreatores, os quais são animais geneticamente modificados que são utilizados na produção de proteínas humanas recombinantes utilizadas em terapêuticas específicas. Apesar de existir a produção dessas proteínas por microrganismos ou por cultivos de células animais, utilizar animais transgênicos como biorreatores é economicamente favorável. O tecido mais utilizado para a expressão das proteínas recombinantes é a glândula mamária, devido à alta capacidade em realizar síntese proteica e também à facilidade em se obter o leite, quando comparado aos demais fluidos corporais. O sucesso dessa biotecnologia já foi alcançado em várias espécies, e alguns exemplos de animais transgênicos que expressam proteínas recombinantes através do leite são: ovelhas que produzem fatores de coagulação, vacas que expressam hormônio do crescimento e albumina sérica humanos, e cabras que produzem lisozima, antitrombina III, ativador de plasminogênio tecidual humano e butirilcolinesterase humana. Um exemplo de fármaco já aprovado para comercialização é a antitrombina III recombinante humana, que é uma proteína plasmática com propriedades anticoagulantes e antiinflamatórias (BERTOLINI *et al.*, 2016; BORDIGNON, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2017; IBTISHAM *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2015; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011). Apesar disso, essa tecnologia não é tão utilizada, devido à possibilidade da transmissão de doenças dos animais para os humanos (NIEMANN; LUCAS-HAHN, 2012).

2.6.3.3 Animais como Modelos para Pesquisas

Animais são rotineiramente utilizados como cobaias para diferentes tipos de pesquisa, incluindo o estudo de processos fisiológicos e condições patológicas, tradução de novas descobertas em aplicação clínica, como testes de eficiência e de segurança de fármacos. Para tal, a criação de animais por clonagem diminui a variabilidade genética, e consequentemente, diminui o número de animais necessários para cada experimento, já que o viés será menor. Clones como modelos para doenças são produzidos pela deleção ou substituição de genes específicos, e o objetivo de sua utilização, é investigar e testar possíveis tratamentos para

essas doenças. A principal espécie animal utilizada como modelo para pesquisa é a murina. Os camundongos apresentam ciclo de vida reduzido, o acesso a todos os estágios de vida é facilitado, há a possibilidade de padronização genética, há disponibilidade de diferentes ferramentas experimentais, os custos são reduzidos, e existem menos quesitos éticos envolvidos em sua utilização, sendo esses, alguns dos argumentos para sua ampla utilização. Apesar disso, em alguns casos, os camundongos não são os animais ideais para experimentos que envolvam doenças e a fisiologia de humanos, sendo os primatas não-humanos os modelos ideais. Por outro lado, a utilização de primatas acarreta maiores custos, baixa disponibilidade, e principalmente, preocupações éticas. Devido a semelhanças anatômicas e fisiológicas com humanos, o uso de suínos de produção ou de mini-*pigs* como modelos para pesquisas para biomedicina humana, tem crescido. A utilização dos suínos também apresenta várias vantagens: ampla disponibilidade de animais, programas de reprodução bem estabelecidos, vida relativamente longa, ciclos reprodutivos rápidos, ninhadas grandes e custos reduzidos, quando comparado com primatas não-humanos e animais de grande porte. Os suínos vêm sendo utilizados como modelos em diferentes áreas da biomedicina, incluindo a bioengenharia, neoplasias, nutrição, modelos para doenças infecciosas, funções respiratórias e imunológicas, cirurgias, xenotransplantes e outras (BORDIGNON, 2017; IBTISHAM *et al.*, 2017; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011; WELLS, 2005).

2.6.3.4 Xenotransplantes

Os xenotransplantes são caracterizados pelo transplante de órgãos entre diferentes espécies animais, o que na medicina humana, pode ser uma solução para tentar cobrir a demanda existente de órgãos, tecidos e células para transplantes (IBTISHAM *et al.*, 2017; NIEMANN; RATH; WRENZYCKI, 2003). A realidade do xenotransplante de órgãos sólidos só é possível com a modificação genética dos animais doadores, e a espécie doadora de eleição é a suína, devido a semelhanças anatômicas, fisiológicas e metabólicas que os suínos têm com a espécie humana; apesar disso, o enxerto de tecidos e órgãos de suínos sem modificações genéticas gera uma reação imune exacerbada no hospedeiro. O entendimento de que existem barreiras para os xenotransplantes mostra que são necessários avanços em tecnologias genéticas para que haja a resolução destes problemas. Os suínos geneticamente modificados devem apresentar a mutação do gene α -1,3-galactosiltransferase (GGTA1), que tem a função de sintetizar a enzima que produz os epítomos (xenoantígenos) da galactose- α 1,3-galactose (Gal), cuja presença nos órgãos transplantados gera uma rejeição hiperaguda

no hospedeiro, já que humanos apresentam anticorpos contra esse antígeno. Subsequentemente, vários outros fatores vêm sendo modificados para gerar órgãos de suínos relativamente seguros para serem xenotransplantados em humanos (GOCK *et al.*, 2011; LAI *et al.*, 2002; LEE; PRATHER, 2014).

Algumas das reações de incompatibilidade que o indivíduo transplantado pode apresentar são: rejeição hiperaguda, desordens de coagulação, lesão de isquemia-reperfusão, resposta imune inata, rejeição induzida por anticorpos, rejeição mediada por células, incompatibilidades associadas à função do órgão. Sabendo desses possíveis problemas, os indivíduos transplantados recebem imunossupressores na tentativa de diminuir a resposta celular mediada pelo organismo (GOCK *et al.*, 2011). Devido a estas respostas do hospedeiro, a taxa de sucesso da técnica ainda é muito baixa (IBTISHAM *et al.*, 2017).

2.6.4 Preservação de Espécies Animais Ameaçadas de Extinção

A clonagem por TNCS pode ser utilizada como uma ferramenta na prevenção da extinção de espécies animais ameaçadas, e mostra-se como uma importante biotécnica reprodutiva para auxiliar no resguardo da diversidade genética em pequenas populações de espécies animais (HEYMAN, 2005; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011).

Um importante fator limitante para a clonagem de espécies ameaçadas é a baixa disponibilidade de oócitos para realização da TNCS. Uma solução para isto é utilizar oócitos e células doadoras de espécies diferentes, sendo que as células doadoras de núcleo serão as do indivíduo que se quer clonar; esta é chamada de clonagem por TNCS interespecies. Apesar de ser considerada uma solução, poucos animais clonados nasceram vivos a partir da clonagem por TNCS interespecies (BORDIGNON, 2017). Mesmo sua realização sendo bem sucedida, pouco se sabe sobre a implicação da heteroplasmia parcial ou total do DNA mitocondrial sobre os produtos desse tipo de clonagem (BOWLES; CAMPBELL, St. JOHN, 2007; LOI; GALLI; PTAK, 2007; St. JOHN *et al.*, 2010).

Exemplos em que a clonagem interespecies foi bem sucedida:

- Gauro (*Bos gaurus*) utilizando oócitos de bovinos domésticos (*Bos taurus*; LANZA *et al.*, 2000);
- Muflão (*Ovis orientalis musimon*) utilizando oócitos de ovinos domésticos (*Ovis aries*; LOI *et al.*, 2001);
- Gato-selvagem-africano (*Felis silvestris lybica*) utilizando oócitos de felinos domésticos (*Felis catus*; GÓMEZ *et al.*, 2004);

- Lobo-cinzento (*Canis lupus*) utilizando oócitos de caninos domésticos (*Canis familiaris*; KIM *et al.*, 2007);
- Bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*), um caprino selvagem extinto, utilizando oócitos de caprinos domésticos (*Capra hircus*; FOLCH *et al.*, 2009);

Estes são exemplos bem sucedidos que confirmam que a utilização da clonagem por TNCS interespecíes de fato funciona, pelo menos quando os oócitos e as fêmeas receptoras são de espécies diferentes, mas do mesmo gênero (GÓMEZ *et al.*, 2009; LOI; GALLI; PTAK, 2007; MASTROMONACO; KING, 2007).

A clonagem de animais já extintos é outra realidade, sendo realizada na intenção de trazer essas espécies de volta, como por exemplo, o mamute-peludo (*Mammuthus primigenius*), no qual se poderiam utilizar oócitos e fêmeas receptoras de elefante-asiático (*Elephas maximus*; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011).

Wells (2005) ressalva que de qualquer forma, é válido considerar criopreservar células somáticas dessas espécies ameaçadas de extinção como um método de segurança contra possíveis perdas futuras de biodiversidade.

2.6.5 Outras Aplicações

Uma aplicação menos comum para a clonagem animal é a sua utilização em animais de companhia. Em alguns casos, esses *pets* são animais transgênicos, como na criação de anêmonas-do-mar, água-vivas ou peixes-zebra que expressam proteínas fluorescentes, os quais são conhecidos pelo termo “*GloFish*”. Outro exemplo aplicado a animais transgênicos de companhia são os gatos hipoalergênicos, nos quais se remove o gene que expressa o principal alérgeno dos gatos (Fel d 1; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011).

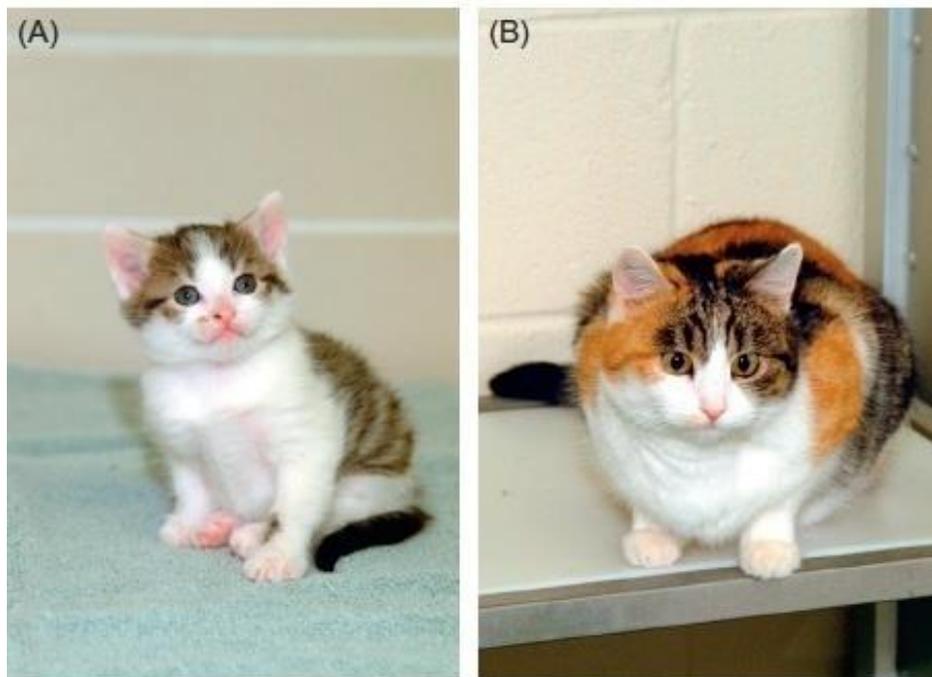
Outros casos visam utilizar a clonagem animal, a pedido dos donos, para a clonagem de seus animais falecidos. Sabe-se que a clonagem de animais não resulta no mesmo animal, mas nota-se grande semelhança em aspectos fenotípicos entre o produto clonado e o doador de células. A maioria dos tutores que pretende clonar seus animais de estimação, provavelmente ficará muito satisfeita com o produto, apesar de que algumas diferenças fenotípicas podem ser notadas entre os dois indivíduos; por exemplo, se o animal apresentar pintas ou manchas pelo corpo, provavelmente elas não serão idênticas no animal clone, mas serão suficientemente semelhantes. O primeiro felino doméstico clonado por Shin *et al.* (2002; Figura 8), chamado “CC”, de *CopyCat*, nasceu em dezembro de 2001, produto da gata doadora de células “Rainbow”. Ambas as gatas são fêmeas malhadas e de pelo calico e curto.

Já o primeiro cão (Figura 9), Snuppy, foi clonado em 2005 por Lee *et al.* (2005), produto de um macho da raça Galgo afegão (ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011; SEIDEL Jr; 2014).

Ormandy, Dale e Griffin (2011) relataram que a indústria de animais geneticamente modificados tende a avançar, com isso, existe a possibilidade de que animais de estimação geneticamente modificados se tornem parte do cotidiano de médicos veterinários de pequenos animais. Já existem evidências de que os clientes indagam a esses profissionais sobre a possibilidade de clonar seus *pets* falecidos.

Outra abordagem, que também é menos comum, é a clonagem de animais atletas, como cavalos e camelos de corrida. Quando o objetivo dos proprietários é clonar esses animais devido a suas habilidades atléticas, o resultado pode ser decepcionante. Isto ocorre devido a essas características apresentarem grande influência ambiental, o que até pode ser controlado em alguns casos; já os efeitos epigenéticos são praticamente impossíveis de controlar, e o produto poderá não apresentar o desempenho atlético esperado. Em casos em que se quer clonar um animal devido a suas habilidades reprodutivas, o sucesso é bem mais provável, já que isso depende principalmente de sua genética. Outra possibilidade é clonar animais estéreis ou castrados que se gostaria de utilizar para reprodução; nestes casos, o produto deve desempenhar sua função reprodutiva com êxito (SEIDEL Jr; 2014).

Figura 8. Primeiro felino doméstico clone e a gata doadora de células. **a.** “CC”, o primeiro felino doméstico clonado, com 7 semanas de vida; **b.** “Rainbow”, a gata doadora das células.



Fonte: Seidel Jr. (2014, p. 87).

Figura 9. Primeiro cachorro clone, do doador de células e da fêmea receptora. **a.** à direita, Snuppy, o primeiro cão clonado, com 67 dias de vida, e à esquerda o macho de 3 anos da raça Galgo afegão, que foi o doador das células somáticas; **b.** à esquerda, Snuppy, e à direita a fêmea receptora de Labrador Retriever amarela em quem o embrião foi implantado e por quem Snuppy foi criado.



Fonte: Lee *et al.* (2005, p. 641).

2.7 Questões Relacionadas à Saúde e ao Bem-Estar Animal

A saúde animal pode ser descrita como a condição em que o animal consiga realizar todas as suas funções biológicas. Já o bem-estar animal está relacionado com o modo de criação dos animais, e este pode ser estimado a partir da observação das Cinco Liberdades do Bem-Estar Animal, em que os animais devem estar: 1. livres de desconforto; 2. livres de fome e sede; 3. livres de medo e estresse; 4. livres de dor, ferimentos e doenças; 5. livres para expressar seu comportamento natural (BANG *et al.*, 2015; BULLER *et al.*, 2018). Como já mencionado, os animais produtos da clonagem podem sofrer diferentes problemas em diferentes sistemas corporais (Tabela 2 e Tabela 3), e estas anormalidades, que podem ocorrer em vários estágios da vida do animal, acabam sendo motivo de questionamentos quanto à qualidade de vida, à saúde e ao bem-estar desses animais clones. Uma das principais anormalidades que ocorrem, principalmente em ruminantes, é o crescimento exagerado de fetos (AOS; IBTISHAM *et al.*, 2016), gerando produtos até 30% maiores do que o normal. Como resultado desta anomalia, as receptoras que gestam estes fetos acabam sofrendo dores relacionadas à prenhez e também dificuldades de parição, e isso é contrário aos princípios do bem-estar animal, principalmente na liberdade que diz respeito à dor e ao sofrimento (SHRIVER, 2015). Desta forma, entender como esse tipo de anomalia funciona é benéfico tanto para o aumento da eficiência da técnica, como também para a diminuição dos problemas relacionados ao bem-estar dos clones e das suas receptoras (LEWIS *et al.*, 2004; SIMMET;

WOLF; ZAKHARTCHENKO, 2021). Além disso, pode haver necessidade da realização de procedimentos invasivos para realização de alguma biotécnica reprodutiva. Alguns exemplos são: cesarianas em casos de fetos muito grandes, transferência embrionária cirúrgica em algumas espécies, protocolos de superovulação e aspiração folicular, entre outros (ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011).

Apesar disso, Vajta e Gjerris (2006) trazem uma perspectiva diferente, que mostra que em alguns casos, a engenharia genética pode melhorar o bem-estar dos animais geneticamente modificados. Isto é alcançado pela diminuição do sofrimento físico ou mental, como no caso de animais resistentes a doenças (DAHL *et al.*, 2003). Alguns dos exemplos são: vacas resistentes à mastite, animais resistentes a doenças causadas por príons (como a encefalopatia espongiforme bovina, BSE, e o *scrapie*), além da resistência a diferentes infecções virais e bacterianas (PATERSON *et al.*, 2003).

2.8 Preocupações Éticas Relacionadas à Clonagem

Provavelmente, não exista outra tecnologia biomédica que tenha mais controvérsias éticas ou medo associado quanto a clonagem. Algumas das preocupações sobre a técnica são reais e substanciais, mas em sua maioria são resultado de equívocos científicos e do desconhecimento. Esses medos e apreensões têm origem de diferentes fontes culturais, sendo que a clonagem parece representar uma ameaça à vida, que é sagrada. A clonagem pode ser entendida como uma forma pejorativa à vida, pois muitos temem que com a facilidade em duplicar indivíduos, esta se torne barata e deixe de ser respeitada. Em geral, a sociedade parece ver a clonagem animal e qualquer tipo de modificação genética de forma negativa, seja em animais ou em plantas, principalmente quando estas estão relacionadas com a produção de alimentos para consumo humano (CIBELLI *et al.*, 2002; GREEN, 2002; GREEN, 2014; GURDON; COLMAN, 1999; FIESTER, 2005; LEWIS *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2019;).

De maneira contrária, algumas pessoas enxergam a clonagem como uma tecnologia que leva à “imortalidade”, como se as vidas pudessem ser perpetuadas em um novo corpo, o clone. Isto é fruto de um desconhecimento e da informação errônea que leva a achar que indivíduos com o mesmo genótipo serão idênticos. Essas questões de medo ou de esperança extremos não podem ser desconsideradas, mas é importante entender que as análises sobre esse assunto devem vir a partir de fatos concretos, científicos e sociais (GREEN, 2002).

Cibelli *et al.* (2002) relatam que muitas das inseguranças populacionais são alimentadas por relatos e imagens de defeitos e anormalidades que são retratados pela mídia, e ainda, existem cientistas da área, que tendo com o objetivo retratar a clonagem como perigosa e irresponsável, relatam e acentuam dados sobre as falhas e ineficiências da clonagem. Fiester (2005) coloca que alguns dos argumentos utilizados contra a clonagem animal são facilmente refutados, todavia, outros argumentos constituem objeções sérias à ciência da clonagem e que precisam de maior reflexão e de debate público.

No cenário da clonagem animal, as preocupações são baseadas em que o sucesso da técnica para clonar animais pode facilmente ser utilizado para clonar humanos; ou ainda relacionadas à saúde humana que pode ser afetada quando ocorrer o consumo de animais geneticamente modificados (FIESTER, 2005). Além dessas, existem preocupações relacionadas à saúde e ao bem-estar dos clones, animais geneticamente modificados ou envolvidos, sendo que as quatro principais áreas de preocupação são: o sofrimento; as possíveis complicações obstétricas nas fêmeas receptoras; a saúde dos clones; e os clones ainda podem sofrer mais, pois tendem a ser utilizados em exposições, os procedimentos de pesquisa provavelmente serão rotineiros, ou ainda, podem ter alguma anomalia associada. Além das preocupações com o bem-estar animal e com as consequências que a clonagem pode causar, ainda existe a fundamentação deontológica, que foca em princípios morais, incluindo noções sobre a ética animal, adicionando conceitos de valor intrínseco dos animais ou ainda de “integridade” ou de “dignidade”; além das crenças que discutem que a natureza dos animais é modificada quando esse tipo de biotecnologia é aplicado. Existe ainda uma preocupação ética sobre “brincar de Deus”, o que faz uma referência ao quanto se consegue manipular o nascimento de indivíduos, o que é visto como uma desvalorização do valor intrínseco dos animais e no acarretamento de sua objetificação e mercantilização. As opiniões quanto aos limites que devem ser estabelecidos sobre a engenharia genética são variáveis e dependem de diferentes pontos de vista (BROOKS; LUSK, 2011; FARSTAD, 2018; FIESTER, 2005; ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011; SINHA *et al.*, 2019).

Em alguns casos, a clonagem é vista como uma forma de evolução para os humanos, já que utilizar animais geneticamente modificados para o tratamento de disfunções em pessoas pode ser aceitável, seja porque existem benefícios médicos envolvidos, porque isso ajuda a diminuir o número de animais de experimentação necessários ou ainda pelo ponto de vista de que uma vida humana é superior a uma vida animal. De maneira contrária, alguns enxergam a engenharia genética como moralmente incorreta, seja por desrespeitar a integridade dos animais, por aumentar muito o poder das pessoas sobre os animais ou ainda

por poder ocorrer um desbalanço ecossistêmico. Existem ainda aqueles que não se baseiam em opiniões extremas, e aceitam mais facilmente algum tipo de uso da engenharia genética do que outros; por exemplo, em geral, a população aceita muito mais utilizar animais geneticamente modificados para aplicações biomédicas do que para uso na alimentação humana (ORMANDY; DALE; GRIFFIN, 2011).

Outro cenário engloba preocupações com os danos ao ambiente que esses animais clones podem causar, seja pela reprodução com animais não- clones ou ainda pela expressão gênica imprevista que possa causar alterações de biomas não esperadas. Em outro ramo, a clonagem de animais de estimação, existe um potencial para falsas promessas, já que tutores em luto e com pouco conhecimento sobre a área, buscam a técnica com a ideia de ressuscitar seus animais de estimação, o que não acontecerá desta maneira (FIESTER, 2005).

Green (2002) destaca que de qualquer forma, a clonagem pode ser motivo de uma grande antipatia social, a qual é baseada principalmente na falta de compreensão a respeito da ciência envolvida. Tudo isso pode levar a uma percepção de que valores importantes para a sociedade humana possam ser rompidos com a utilização desta técnica. Parte dessa oposição pode diminuir quando a sociedade entender a ciência da técnica e quando for comprovado que a clonagem como ferramenta reprodutiva é segura, tanto fisiológica como psicologicamente. De qualquer forma, é importante lembrar que os cientistas envolvidos com a clonagem devem estar constantemente cientes de que trabalham com um tema controverso. Por outro lado, estes pesquisadores podem ajudar a reduzir esses medos e incertezas da população, fazendo esforços para que seu trabalho esteja conforme os mais altos padrões de pesquisa, quando estas envolvem a espécie humana. Ormandy, Dale e Griffin (2011) complementam que mesmo assim, limites para o uso da engenharia genética devem ser estabelecidos, utilizando a opinião de especialistas na área e a opinião pública, pois esta representa grande força. Tudo isso destaca a importância de o médico veterinário estar envolvido neste tipo de discussão, já que estes são profissionais da saúde e especialistas na saúde animal. No Brasil, a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, em seu Artigo 6º, proíbe a clonagem humana e procedimentos de engenharia genética em células germinativas, zigotos e embriões humanos, sendo este tipo de procedimento permitido apenas em animais não-humanos (BRASIL, 2005).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A clonagem animal mostra-se como uma biotécnica da reprodução que apresenta diversos benefícios nas áreas da pesquisa, da engenharia genética, da reprodução animal, e até mesmo da Medicina Humana. Ao longo dos anos, as etapas técnicas vêm sendo aprimoradas e a eficiência tem aumentado cada vez mais, apesar de ainda ser baixa. O nascimento de animais clones e geneticamente modificados é uma realidade. Por outro lado, perdas gestacionais, falhas no desenvolvimento dos clones e anomalias são comumente observadas na utilização desta técnica em relação à reprodução *in vivo* e a outras técnicas de reprodução *in vitro*, como a FIV.

As técnicas para realização da clonagem são variadas e trabalhosas, necessitando de cuidados especiais e habilidades técnicas aprimoradas para produzir embriões clones viáveis. Além disso, algumas técnicas exigem equipamentos sofisticados e de manuseio cauteloso. Todavia, quando bem realizada, a técnica pode apresentar uma aplicabilidade variada, tanto para o uso aplicado às melhorias na produção animal e à preservação de espécies em risco de extinção, como também para pesquisas e aplicações terapêuticas direcionadas ao tratamento de disfunções em humanos.

Apesar de todo esse benefício que a clonagem é capaz de proporcionar, a técnica é associada a questões de ordem ética e moral, além de ser contrária a ideologias religiosas e de bem-estar animal. De fato existem alguns pontos que podem ser aperfeiçoados e que merecem atenção dos cientistas envolvidos com a clonagem. Por outro lado, a maioria de possíveis preconceitos é oriunda da desinformação e de conceitos errôneos. De qualquer forma, é necessário que se estabeleçam limites na aplicação da técnica, e que o bom senso e os quesitos morais prevaleçam, sempre respeitando as opiniões de especialistas na área, mas também permitindo que as ideologias sociais sejam manifestadas e escutadas. Por fim, os médicos veterinários e demais profissionais que estão inseridos nesta área devem entender que seu trabalho pode ser controverso, tendo o dever de informar a sociedade, a fim de desmistificar alguns aspectos que dizem respeito à clonagem, além de demonstrarem as diferentes vantagens e limitações que a técnica apresenta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. H. *et al.* Probability, odds and random chance: the difficult task of modulating the epigenetic profile of cloned embryos. **Animal Reproduction**. Porto Alegre, Brazil, v. 14, n. 1, p. 102-123, Jan./Mar. 2017.
- BAGUISI, A. *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**. North Grafton, United States of America, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.
- BALDASSARRE, H. *et al.* State of the art in the production of transgenic goats. **Reproduction, Fertility and Development**. Quebec, Canada, v. 16, p. 465-470, 2004.
- BANG, J. I. *et al.* Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. **Theriogenology**. Republic of Korea, v. 84, n. 4, p. 509-523, 2015.
- BATCHALDER, C. A. *et al.* Cardiac adaptations in SCNT newborn cloned calves during the first month of life assessed by ecocardiography. **Theriogenology**. Davis, United States of America, v. 103, p. 153-161, 2017.
- BATCHALDER, C. A. *et al.* Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning and Stem Cells**. Davis, United States of America. v. 9, n. 1, p. 63-82, 2007.
- BAVISTER, B. D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**. New Orleans, United States of America, v. 124, p. 181-196, 2002.
- BEAUJEAN, N. *et al.* Reprogrammation et épigénèse. **Médecine/sciences**. Jouy-en-Josas, France, v. 21, p. 412-421, 2005.
- BECKETT, E. M. *et al.* Developmental programming: impact of testosterone on placental differentiation. **Reproduction**. Ann Arbor, United States of America, v. 148, p. 199-109, 2014.
- BEHBOODI, E. *et al.* Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 459-474.
- BERTOLINI, L. R. *et al.* The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. **Transgenic Research**. Porto Alegre, Brazil, v. 25, p. 329-343, 2016.
- BERTOLINI, M. *et al.* Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, Brazil, v. 31, n. 3, p. 391-405, July/Sep. 2007.
- BERTOLINI, M. Impact of advanced reproductive biotechnologies on animal health and livestock production. **Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**. Brazil, v. 56, n. 3, p. 215-227, 2009.

BORDIGNON, V. Animal cloning – state of the art and applications. **Reference Module in Life Sciences**. Montreal, Canada, p. 1-17, 2017.

BOWLES, E. J.; CAMPBELL, K. H. S.; St. JOHN, J. C. Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). **Current Topics in Developmental Biology**. Birmingham, United Kingdom, v. 77, p. 251-290, 2007.

BRASIL. Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do par. 1º do Art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CNTBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a medida provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os Arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 10º da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: capítulo 1, [S. l.], 24 mar. 2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm. Acesso em: 05 de maio de 2021.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Zoology**. Philadelphia, United States of America, v. 38, p. 455-463, 1952.

BROOKS, K. R.; LUSK, J. L. U.S. consumers attitudes toward farm animal cloning. **Appetite**. Canyon, United States of America, v. 57, p. 483-492, 2011.

BULLER, H. *et al.* Towards farm animal welfare and sustainability. **Animals**. Devon, United Kingdom, v. 8, n. 81, p. 1-13, May 2018.

CAMPBELL, K. H. S. *et al.* Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**. Loughborough, United Kingdom, v. 68S, p. S214-S231, 2007.

CARNEIRO, I. S. *et al.* Milk from transgenic goat expressing human lysozyme for recovery and treatment of gastrointestinal pathogens. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. Fortaleza, Brazil, v. 112, p. 79-86, 2017.

CHAVATTE-PALMER, P. *et al.* Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning and Stem Cells**. Domaine de Vilvert, France, v. 6, n. 2, p. 94-100, 2004.

CHAVATTE-PALMER, P. *et al.* Pregnancy and neonatal care of SCNT animals. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 107-122.

CHESNÉ, P. *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature Biotechnology**. Jouy-en-Josas, France, v. 20, p. 366-369, Apr. 2002.

CHOI, Y. H. *et al.* Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. **Theriogenology**. Seoul, South Korea, v. 58, p. 1187-1197, 2002.

- CIBELLI, J. B. *et al.* The health profile of cloned animals. **Nature Biotechnology**. Loughborough, United Kingdom, v. 20, p. 13-14, Jan. 2002.
- CONSTANT, F. *et al.* Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydroallantois. **Biology of Reproduction**. Jouy-en-Josas, France, v. 75, p. 122-130, 2006.
- DAHL, K. *et al.* Outline of a risk assessment: the welfare of future xeno-donor pigs. **Animal Welfare**. Denmark, v. 12, n. 2, p. 219-237, May 2003.
- DI BERARDINO, M. A. Animal cloning - the route to new genomics in agriculture and medicine. **Differentiation**. Philadelphia, United States of America, v. 68, p. 67-83, 2001.
- DOMINKO, T. *et al.* Optimization strategies for production of mammalian embryos by nuclear transfer. **Cloning**. Beavertor, United States of America, v. 1, n. 3, p. 143-152, 1999.
- DRIESCH, H. Entwicklungsmechanische studien. I. Der werth der beiden ersten furchungszellen in der echinodermentwicklung. Experimentelle erzeugung von theil-und doppelbildungen. **Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie**. Neapel, v. 53, p. 160-178, Okt. 1891.
- FABER, D. C. *et al.* Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**. Sioux Center, United States of America, v. 59, p. 125-138, 2003.
- FARIN, C. E.; FARMER, P. W.; FARIN, P. W. Pregnancy recognition and abnormal offspring syndrome in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**. Raleigh, United States of America, v. 22, p. 75-87, 2010.
- FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**. Raleigh, United States of America, v. 65, p. 178-191, 2006.
- FARSTAD, W. Ethics in animal breeding. **Reproduction in Domestic Animals**. Oslo, Norway, v. 53, n. 3, p. 4-13, 2018.
- FELTRIN, C. *et al.* Effects of oocyte source, cell origin, and embryo reconstruction procedures on *in vitro* and *in vivo* embryo survival after goat cloning. **Animal Reproduction**. Fortaleza, Brazil, v. 14, n. 4, p. 1110-1123, Oct./Dez. 2017.
- FELTRIN, C. *et al.* *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by handmade cloning using a modified WOW culture system. **Reproduction, Fertility and Development**. Porto Alegre, Brazil, v. 18, n. 2, p. 126, 2006.
- FIESTER, A. Ethical issues in animal cloning. **Perspectives in Biology and Medicine**. Philadelphia, United States of America, v. 48, n. 3, p. 328-343, 2005.
- FISSORE, R. A. *et al.* Activation of mammalian oocytes. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 21-45.

- FOLCH, J. *et al.* First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**. Zaragoza, Spain, v. 71, n. 6, p. 1026-1034, 2009.
- FOOTE, R. H. Historical perspective. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 3-18.
- GALLI, C. *et al.* A cloned horse born to its dam twin. **Nature**. Cremona, Italy, v. 424, p. 635, Aug. 2003.
- GALLI, C. *et al.* Somatic cell nuclear transfer in horses. **Reproduction in Domestic Animals**. Cremona, Italy, v. 43, n. 2, p. 331-337, 2008.
- GARDNER, D. K.; LANE, M. Culture of viable mammalian embryos *in vitro*. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 63-79.
- GARDNER, R. L. Mammalian cloning: challenges for the future. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 497-501.
- GEORGE, A. *et al.* Production of cloned and transgenic embryos using buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells isolated from *in vitro* fertilized and cloned blastocysts. **Cellular Reprogramming**. Karnal, India, v. 13, n. 3, p. 263-272, 2011.
- GERGER, R. P. C. *et al.* Impact of cumulative gain in expertise on the efficiency of handmade cloning in cattle. **Theriogenology**. Lages, Brazil, v. 95, p. 24-32, 2017.
- GOCK, H. *et al.* Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation. **Transplantation Reviews**. Melbourne, Australia, v. 25, p. 9-20, 2011.
- GÓMEZ, M. C. *et al.* Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. **Cloning and Stem Cells**. New Orleans, United States of America, v. 6, n. 3, p. 247-258, 2004.
- GÓMEZ, M. C. *et al.* Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. **Reproduction, Fertility and Development**. New Orleans, United States of America, v. 21, p. 76-82, 2009.
- GÓMEZ, M. C.; POPE, C. E.; DRESSER, B. L. Nuclear transfer in cats and its application. **Theriogenology**. New Orleans, United States of America, v. 66, p. 72-81, 2006.
- GREEN, R. M. Ethical implications of cloning. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 477-493.
- GREEN, R. M. Ethical implications of reproductive cloning. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 497-505.
- GURDON, J. B. Adult frogs derived from nuclei of single somatic cells. **Developmental Biology**. Oxford, England, v. 4, p. 256-273, 1962.

GURDON, J. B.; COLMAN, AL; The future of cloning. **Nature**. United Kingdom, v. 402, p. 743-746, Dec. 1999.

HEYMAN, Y. *et al.* Frequency of occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**. Jouy-en-Josas, France, v. 66, p. 6-13, 2002.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**. Jouy-en-Josas, France, v. 45, p. 353-361, 2005.

HILL, J. R.; CHAVATTE-PALMER, P. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 247-266.

IBTISHAM, F. *et al.* Animal cloning applications and issues. **Russian Journal of Genetics**. Zhanjiang, China, v. 53, n. 9, p. 965-971, 2017.

IBTISHAM, F. *et al.* Animal cloning drawbacks an-overview. **Journal of Dairy, Veterinary and Animal Research**. Zhanjiang, China, v. 3, n. 4, June 2016.

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

JANSSEN, D. L. *et al.* Postnatal management of crhyptorchid banteng calves cloned by nuclear transfer utilizing frozen fibroblast cultures and enucleated cow ova. **Reproduction, Fertility and Development**. Auburn, United States of America, v. 16, p. 224, 2004.

KATO, Y. *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**. Nakamachi, Japan, v. 282, p. 2095-2098, Dec. 1998.

KHAN, S. *et al.* Comparison of efficiency of *in vitro* cloned sheep embryo production by conventional somatic cell nuclear transfer and handmade cloning technique. **Reproduction in Domestic Animals**. Srinagar, India, v. 53, p. 512-518, 2018.

KIM, M. K. *et al.* Endangered wolves cloned from adult somatic cells. **Cloning and Stem Cells**. Seoul, Korea, v. 9, n. 1, p. 130-137, 2007.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **TRENDS in Biotechnology**. Mariensee, Germany, v. 22, n. 6, p. 286-294, June 2004.

KUROME, M. *et al.* Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: Multi-factorial analysis of a large data set. **BMC Biotechnology**. Munich, Germany, v. 13, p. 13-43, 2013.

- LAI, L. *et al.* Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. **Science**. Columbia, United States of America, v. 295, p. 1089-1092, Feb. 2002.
- LANZA, R. P. *et al.* Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning**. Worcester, United States of America, v. 2, n. 2, p. 79-90, 2000.
- LEE, B. C. *et al.* Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**. Seoul, South Korea, v. 436, p. 641, Aug. 2005.
- LEE, K.; PRATHER, R. S. Cloning pigs by somatic cell nuclear transfer. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 245-254.
- LEWIS, I. M. *et al.* Commercial aspects of cloning and genetic modification in cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. Melbourne, Australia, v. 44, p. 1105-1111, 2004.
- LI, G.; WHITE, K. L.; BUNCH, T. D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning and Stem Cells**. Utah, United States of America, v. 6, n. 1, p. 5-13, 2004.
- LI, Z. *et al.* Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. **Developmental Biology**. Iowa City, United States of America, v. 293, n. 2, p. 439-448, 2006.
- LIU, T. *et al.* Factors determining the efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer: data analysis with over 200,000 reconstructed embryos. **Cellular Reprogramming**. Shenzhen, China, v. 17, n. 6, 2015.
- LOEB, J. Über eine einfache Methode, zwei oder mehr zusammengewachsene Embryonen aus einem Ei hervorzubringen. **Pflüger's Archiv**. Chicago, United States of America, v. 55, p. 525-530, 1894.
- LOI, P. *et al.* Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using *post-mortem* somatic cells. **Nature Biotechnology**. Teramo, Italy, v. 19, n. 10, p. 962-964, Oct. 2001.
- LOI, P.; GALLI, C.; PTAK, G. Cloning of endangered mammalian species: any progress? **TRENDS in Biotechnology**. Teramo, Italy, v. 25, n. 5, p. 196-200, Mar. 2007.
- MARTINS, L. T. *et al.* Production of recombinant therapeutic proteins genetically engineered animals: the dawn of a new era. **Acta Scientiae Veterinariae**. Fortaleza, Brazil, v. 43, p. 1-27, 2015.
- MASTROMONACO, G. F.; KING, W. A. Cloning in companion animal, non-domestic and endangered species: can the technology become a practical reality? **Reproduction, Fertility and Development**. Guelph, Canada, v. 19, p. 748-761, 2007.
- McGRATH J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**. Philadelphia, United States of America, v. 37, p. 179-183, May 1984.

- McKINNELL, R. G.; DI BERARDINO, M. A. The biology of cloning: history and rationale. **BioScience**. United States of America, v. 49, n. 11, p. 875-885, Nov. 1999.
- NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in Domestic Animals**. Mariensee Germany, v. 47, p. 2-10, 2012.
- NIEMANN, H.; RATH, D.; WRENZYCKI, C. Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. **Reproduction in Domestic Animals**. Mariensee, Germany, v. 38, p. 82-89, 2003.
- OBACK, B.; WELLS, D. N. Cloning cattle. **Cloning and Stem Cells**. Hamilton, New Zealand, v. 5, n. 4, p. 243-256, 2003.
- OGONUKI, M. *et al.* Early death of mice cloned from somatic cells. **Nature Genetics**. Tokyo, Japan, v. 30, p. 253-254, Mar. 2002.
- ONGARATTO, F. L. *et al.* Influence of oocyte selection, activation with a zinc chelator and inhibition of histone deacetylases on cloned porcine embryo and chemically activated oocytes development. **Zygote**. Saint Paul, United States of America, v. 28, p. 286-290, Aug. 2020.
- ORMANDY, E. H.; DALE, J.; GRIFFIN, G. Genetic engineering of animals: Ethical issues, including welfare concerns. **The Canadian Veterinary Journal**. Ottawa, Canada, v. 53, p. 544-550, May 2011.
- PAGE, R. L. Micromanipulation techniques for cloning. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 155-173.
- PAGE, R. L.; AMBADY, S. Animal cloning applications in agriculture. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**. Worcester, United States of America, p. 27-31, Mar./Apr. 2004.
- PALMIERI, C. *et al.* Review paper: A review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. **Veterinary Pathology**. Teramo, Italy, v. 45, p. 865-880, 2008.
- PANARACE, M. *et al.* How healthy are clones and their progeny: 5 years of Field experience. **Theriogenology**. Buenos Aires, Argentina, v. 67, p. 142-151, 2007.
- PATERSON, L. *et al.* Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. Applications of reproductive cloning. **Animal Reproduction Science**. Roslin, Scotland, v. 79, p. 137-143, 2003.
- PEREIRA, A. F. *et al.* Analysis of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**. Fortaleza, Brazil, v. 109, p. 163-172, 2013.

- PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, Brasil, v. 33, n. 3, p. 118-128, jul./set. 2009.
- PEREIRA, L. S. *et al.* Pathological features of cloned calves that died in the neonatal period. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Brasília, Brazil, v. 40, n. 11, p. 852-862, Nov. 2020.
- PERRY, A. C. F.; WAKAYAMA, T. Untimely ends and new beginnings in mouse cloning. **Nature Genetics**. Worcester, United States of America, v. 30, p. 243-244, Mar. 2002.
- POLEJAEVA, I. A. *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**. Blacksburg, United States of America, v. 407, p. 86-90, Sep. 2000.
- PRATHER, R. S. *et al.* Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of Reproduction**. Madison, United States of America, v. 37, p. 859-866, 1987.
- PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of Reproduction**. Madison, United States of America, v. 41, p. 414-418, 1989.
- RHIND, S. M. *et al.* Cloned lambs – lessons from pathology. **Nature Biotechnology**. Roslin, United Kingdom, v. 21, n. 7, p. 744-745, July 2003.
- SCHNIEKE, A. E. *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**. Roslin, Scotland, v. 278, p. 2130-2133, Dec. 1997.
- SHAH, R. A. *et al.* Hand-made cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: comparison of different media and culture systems. **Cloning and Stem Cells**. Karnal, India, v. 10, n. 4, p. 435-442, 2008.
- SHAH, R. A. *et al.* Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**. Karnal, India, v. 71, p. 1215-1219, 2009.
- SHIN, T. *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**. College Station, United States of America, v. 415, p. 859, Feb. 2002.
- SHRIVER, A. Would the elimination of the capacity to suffer solve ethical dilemmas in experimental animal research? **Current Topics in Behavioral Neurosciences**. Philadelphia, United States of America, v. 19, p. 117-132, 2015.
- SIMMET, K.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V. Manipulating the epigenome in nuclear transfer cloning: where, when and how. **International Journal of Molecular Sciences**. Munich, Germany, v. 22, n. 236, p. 1-17, 2021.
- SINHA, N. *et al.* Ethical concerns in animal cloning: possible risks and assessment. **Global Bioethics Enquiry**. Pune, India, v.7, n. 3, p. 128-135, Dec. 2019.

- SEIDEL Jr., G. E. Genetic and phenotypic similarity among members of mammalian clonal sets. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 85-93.
- SPEMANN, H. Embryonic development és induction. **Yale University Press**. New Haven, United States of America, 1938.
- SPEMANN, H. Entwicklungsphysiologische studien am triton-ei II. **Archiv f. Entwicklungsmechanik**. Würzburg, Germany, v. 15, p. 448-534, Juni 1902.
- St. JOHN, J. C. *et al.* Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**. Clifford, United Kingdom, v. 16, n. 5, p. 488-509, 2010.
- TAMASHIRO, K. L. K. *et al.* Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. **Nature Medicine**. Cincinnati, United States of America, v. 8, n. 3, p. 262-267, Mar. 2002.
- THIBAUT, C. Recent data on the development of cloned embryos derived from reconstructed eggs with adult cells. **Reproduction Nutrition Development**. Jouy-en-Josas, France, v. 43, p. 303-324, 2003.
- THUAN, N. V.; KISHIGAMI, S.; WAKAYAMA, T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. **Journal of Reproduction and Development**. Seoul, South Korea, v. 56, n. 1, 2010.
- TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. **Theriogenology**. Pullman, United States of America, v. 64, p. 618-638, 2005.
- TICIANI, E. *et al.* Evidence of metabolic compartmentation in the bovine placenta and significance for the regulation of placenta function and fetal growth in pregnancies bearing *in vivo*- or *in vitro*-produced embryos. **Livestock Science**. Porto Alegre, Brazil, v. 236, p. 1-9, 2020.
- TSUNODA, Y.; KATO, Y. Recent progress and problems in animal cloning. **Differentiation**. Nara, Japan, v. 69, p. 158-161, 2002.
- VAJTA, G. *et al.* Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**. Clayton, Australia, v. 3, n. 2, p. 89-95, 2001.
- VAJTA, G. *et al.* Hand-made cloning approach: potentials and limitations. **Reproduction, Fertility and Development**. Tjele, Denmark, v. 17, p. 97-112, 2005.
- VAJTA, G. Handmade Cloning: the future way of nuclear transfer? **TRENDS in Biotechnology**. Tjele, Denmark, v. 25, n. 6, p. 250-253, 2007.
- VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: State of the art. **Animal Reproduction Science**. Tjele, Denmark, v. 92, p. 211-230, Jan. 2006.

- VAJTA, G.; ZHANG, Y.; MACHÁTY, Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. **Reproduction, Fertility and Development**. Tjele, Denmark, v. 19, p. 403-423, 2007.
- VANDERWALL, D. K. *et al.* Equine cloning: Applications and outcomes. **Reproduction, Fertility and Development**. Moscow, United States of America, v. 18, p. 91-98, 2006.
- WAKAI, T.; ITO, J.; FISSORE, R. A. Artificial activation of mammalian oocytes for cloning: present status and future perspectives. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 3-10.
- WAKAYAMA, S.; CIBELLI, J. B.; WAKAYAMA, T. Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of NT embryos. **Cloning and Stem Cells**. Worcester, United States of America, v. 5, n. 3, p. 181-189, 2003.
- WAKAYAMA, T. *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with *cumulus* cell nuclei. **Nature**. Honolulu, Hawaii, v. 394, p. 369-374, July 1998.
- WALL, R. J. *et al.* Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology**. Beltsville, United States of America, v. 23, n. 4, p. 445-451, Apr. 2005.
- WALL, R. J. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. **Theriogenology**. Beltsville, United States of America, v. 45, p. 57-68, 1996.
- WANI, N. A. *et al.* Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**. Dubai, United Arab Emirates, v. 82, p. 373-379, 2010.
- WELLS, D. N. Animal cloning: problems and prospects. **Revue Scientifique et Technique**. Hamilton, New Zealand, v. 24, n. 1, p. 251-264, Apr. 2005.
- WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**. Cambridge, United Kingdom, v. 320, p. 63-65, Mar. 1986.
- WILMUT, I. *et al.* Somatic cell nuclear transfer. **Nature**. Roslin, United Kingdom, v. 419, p. 583-587, Oct. 2002.
- WILMUT, I. *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**. Roslin, United Kingdom, v. 385, p. 810-813, Feb. 1997.
- WOODS, G. L. *et al.* A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science**. Moscow, United States of America, v. 301, p. 1063, 2003.
- YANAGIMACHI, R. Cloning: experience from the mouse and other animals. **Molecular and Cellular Endocrinology**. Honolulu, Hawaii, v. 187, p. 241-248, 2002.
- YANG, L. *et al.* Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). **Scienceexpress**. Boston, United States of America, v. 350, p. 1101-1104, Oct. 2015.

YOUNG, L. E. *et al.* Epigenetic changes in IGFR2 is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**. Roslin, Scotland, v. 27, p. 153-154, Feb. 2001.

ZHANG, X.; PIEDRAHITA, J. A. Advances in the generations of transgenic domestic species via somatic cell nuclear transfer. In: CIBELLI, J. *et al.* **Principles of Cloning**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 95-106.

ZHOU, K. *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**. Jouy-en-Josas, France, v. 302, p. 1179, Nov. 2003.