

CLONAGEM ANIMAL: A SOBREVIVÊNCIA DOS MAIS APTOS

(Animal cloning: survival of the fittest.)

Luciana Relly BERTOLINI^{1,2}, Cristiano FELTRIN^{1,2}, Saul GAUDENCIO-NETO^{1,2}, Leonardo Tondello MARTINS^{1,2}, Kaio César Simiano TAVARES^{1,2}, Victor Hugo Vieira RODRIGUES^{1,2}, Luís Henrique AGUIAR¹, Carlos Enrique Méndez CALDERÓN¹, Juliana Lopes ALMEIDA¹, Anderson Pinto ALMEIDA¹, Igor de Sá CARNEIRO¹, Ana Karoline Freire COSTA¹, Débora Barbosa RIOS¹, Felipe de Jesus MORAES-JUNIOR¹, Maria da Conceição SOUZA¹, Renna Karoline Eloi COSTA¹, Arthus Sales MORAIS¹, Francisco Xavier Andrade GIRÃO-NETO¹, Luís Fernando SCHÜTZ¹, Marcelo BERTOLINI^{*1,2}

¹ Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza (UNIFOR), ² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Fortaleza, Ceará, Brasil

*E-mail para correspondência: mbertolini@ymail.com

RESUMO

A clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS) apresenta inúmeras aplicações científicas e comerciais, incluindo a produção de animais transgênicos, a preservação de animais de genética desejável, rara ou em extinção, ou mesmo a aplicação para o estudo de aspectos básicos em biologia molecular, celular e do desenvolvimento. Não obstante, a clonagem por TNCS ainda é ineficiente, com menos de 5% dos embriões clones produzidos resultando em animais nascidos vivos. O sucesso na clonagem exige o exímio domínio técnico e científico de várias disciplinas e áreas de conhecimento, havendo pelo menos cinco etapas críticas no processo associadas a falhas de desenvolvimento, desde a produção *in vitro* dos embriões até o nascimento de um animal viável. A identificação de fatores associados às falhas em cada etapa, em especial aqueles relacionados ao oócito receptor (citoplasto), à célula doadora (carioplasto) e aos procedimentos técnicos *per se* de produção de embriões

clones, além da observação cuidadosa dos sinais de anormalidades subsequentes à transferência dos embriões para fêmeas receptoras, é essencial para a otimização de todos os procedimentos para a obtenção, em seu final, de um animal clonado viável e que sobreviva até a vida adulta. Esta revisão visa descrever alguns eventos técnicos e biológicos associados ao sucesso e/ou insucesso da clonagem animal.

Palavras-chave: Clonagem animal, oócitos, células somáticas, embrião, reprogramação epigenética, bovinos.

ABSTRACT

Animal cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) has numerous scientific and commercial applications, including the production of transgenic animals, preservation of animals from desirable or rare gene pools, and animals in risk of extinction, or even for the study of basic aspects in molecular, cell and developmental biology. Nevertheless, cloning by SCNT is still inefficient, with less than 5% of cloned embryos resulting in liveborn animals. The cloning success depends on a proficient technical and scientific know-how of a number of disciplines and areas of knowledge, with at least five critical steps in the process associated with developmental failures, from the *in vitro* production of cloned embryos through the birth of a viable animal. The identification of factors associated with failures in each step, in special to those related to the recipient oocyte (cytoplasm), to the nucleus donor cell (karyoplast), and to the technical procedures for the production of cloned embryos *per se*, along with the careful observation of signs of abnormalities following the transfer of embryos to recipient females, is essential for the optimization of procedures that, ultimately, may result in a cloned animal that survives to adulthood. This review aims to discuss some technical and biological events associated with success and/or failure in animal cloning.

Key words: Animal cloning, oocytes, somatic cells, embryo, epigenetic reprogramming, cattle.

INTRODUÇÃO

Entre várias visões de desenvolvimento das quatro gerações de biotecnologias modernas da reprodução animal (Thibier, 2005), a evolução da clonagem animal pode ser comparada à de uma modalidade esportiva de resistência que poucos têm a aptidão de concluir. Considerando-se o “Espírito Olímpico” atual, o sucesso da clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS) depende da transposição de uma série de obstáculos e dificuldades técnico-biológicas que poderiam ser mais bem definidas como um teste de rusticidade ou mesmo um “pentatlo embrionário”, com a existência de pelo menos cinco etapas complexas e desafiadoras para a produção de um clone que se iniciam na reconstrução *in vitro* dos embriões e que culminam com o nascimento de um animal que sobreviva em seu final, à vida adulta. Cada etapa apresenta-se intimamente dependente de complexos aspectos intrínsecos ou pré-programados e que estão relacionados aos oócitos receptores, às células doadoras, e aos embriões propriamente ditos. Porém, e talvez com mais intensidade, cada etapa também depende de aspectos extrínsecos, de caráter predominantemente ambiental, com a interação entre os fatores intrínsecos e extrínsecos resultando em fenótipos amplamente imprevisíveis no curso do desenvolvimento. Em adição, na corrida contra os fatores adversos neste “pentatlo embrionário” da clonagem, cada uma das cinco etapas depende de eventos predecessores que, invariavelmente, determinam a continuidade ou não do desenvolvimento homeostático pré- e pós-natal subsequentes.

Como no pentatlo moderno, onde o vencedor é considerado o atleta mais completo, no “pentatlo embrionário” da clonagem o vencedor é o animal que apresentar o desenvolvimento mais completo que permita a conclusão do “circuito” de desenvolvimento pré-natal e o nascimento e sobrevivência no “circuito” pós-natal. Para tanto, todos os eventos que permitirem uma programação e reprogramação epigenética nuclear adequada ao padrão embrionário normal de desenvolvimento também permitirão o sucesso na clonagem (Campbell, 2002). Falhas de maior intensidade nestes processos determinarão “desistências” precoces na modalidade, por falhas de desenvolvimento *in vitro* ou *in vivo* dos embriões clonados.

Esta revisão tem por objetivo descrever sumariamente alguns entendimentos atuais de eventos técnicos e biológicos associados ao sucesso e/ou insucesso da clonagem animal, com atenção especial aos bovinos.

Formação e desenvolvimento do conceito bovino

Antes de discutirmos a clonagem, cabe descrevermos sucintamente aspectos do curso normal de desenvolvimento durante a gestação, uma vez que muitos desvios da normalidade observados após algumas manipulações embrionárias, como a clonagem e a fecundação *in vitro* (FIV), estão relacionados a estes eventos (Bertolini et al., 2007).

O termo *concepto* é derivado do latim (*conceptio*) para o produto da concepção, denotando todas as estruturas que se desenvolvem a partir do zigoto, incluindo as estruturas embrionárias, extra-embrionárias, fetais, o feto e a porção embrionária da placenta e membranas associadas durante todo o período da gestação (Hubbert, 1972; Sloss & Dufty, 1980). Por sua vez, com base no padrão de crescimento e desenvolvimento normal do concepto, a gestação ou período pré-natal, da fecundação ao nascimento, pode ser dividido em fases embrionária e fetal (Bertolini et al., 2007), (Fig. 1).

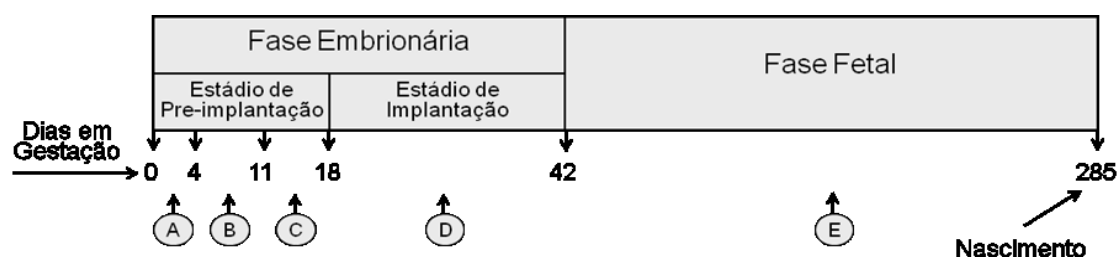


Figura 1. Divisões do período gestacional em bovinos baseado no desenvolvimento do concepto. O estágio de pré-implantação é sub-dividido em (A) concepção até a ativação do genoma, (B) diferenciação embrionária inicial e expansão, (C) alongamento, (D) placentação e organogênese, e (E) maturação e crescimento. Adaptado de Bertolini et al. (2007).

A fase embrionária é um período de diferenciação que inicia imediatamente após a concepção (estádio embrionário de 1-célula) e continua até o final da organogênese (Dia 42 de gestação). Esta fase pode ser subdividida em duas etapas: (1) pré-implantação ou fase embrionária precoce, incluindo (A) o período de clivagem inicial, da concepção até a ativação do genoma embrionário (Dias 1 a 4), (B) a diferenciação embrionária precoce, quando ocorre o início da diferenciação celular, compactação, cavitação, eclosão e expansão (Dias 4 a 10-12), e (C) de alongamento, com o alongamento do trofoblasto, a formação do disco embrionário, o início da formação das membranas extra-embrionárias primitivas, e o reconhecimento materno da prenhez (Dias 10-12 a 17-18); e (2) fase de implantação ou do estágio do embrião propriamente dito, incluindo o período dos dobramentos embrionários, placentação, e organogênese, quando os principais tecidos, órgãos, sistemas e as membranas extra-embrionárias são formadas (Dias 18 a 42). As quatro membranas extra-embrionárias em bovinos são derivadas a partir de tecido extra-embrionário durante a fase embrionária. O saco vitelínico é essencialmente uma estrutura constitutiva, sendo, por simplificação, uma blastocele sobre-expandida revestida internamente por endoderma extra-embrionário e que funciona como um “reservatório”, sustentando o desenvolvimento durante a organogênese e placentação precoces. O alantoide se expande como uma bolsa a partir do intestino primitivo, levando a vasculatura necessária para a formação da vascularização placentária. A expansão do alantoide dentro da membrana coriônica (derivado do trofoblasto alongado) promove a extensão do cório-alantóide ao longo de ambos os cornos uterinos, e o aumento no volume do fluido alantóico intensifica a aposição das membranas contra a parede uterina, facilitando a fixação (implantação), que se inicia durante a fase de implantação entre os dias 17 e 22 da gestação. A implantação por sua vez é um processo gradual e contínuo dividido em três etapas: pré-contato (~Dia 17), aposição (Dias 18 a 19), e adesão, começando em torno do Dia 22. Aos 30 dias de gestação, cotilédones primitivos aparecem em regiões em justaposição com as carúnculas. No Dia 33, cones trofoblásticos formam vilosidades que penetram nas criptas carunculares, produzindo ramos laterais. Pelo Dia 45, criptas e vilosidades são facilmente reconhecíveis. O período do Dia 42 até o nascimento é a fase fetal, um período de crescimento rápido do concepto e de pouca mudança conformacional, com as modestas alterações morfológicas até o parto. Enquanto os placentônios se

desenvolvem e aumentam em massa para prover o suporte ao crescimento fetal, a proporção entre órgãos individuais e peso fetal total muda consideravelmente neste período. O número máximo de placentônios já pode ser observado até o final do primeiro trimestre de prenhez, com alterações subsequentes somente no tamanho dos placentônios (Prior & Laster, 1979; Sloss & Dufty, 1980; Guillomot et al., 1993; Leiser & Kaufmann, 1994; Schläfer et al., 2000). A morte do embrião durante as fases de pré-implantação (prévia ao reconhecimento materno de gestação) ou de implantação (entre o reconhecimento materno de gestação e a fase fetal) é normalmente referido como mortalidade embrionária precoce ou tardia, respectivamente.

O “pentatlo embrionário” da clonagem

As cinco etapas que envolvem a produção *in vitro* de embriões e desenvolvimento *in vivo* para a geração de um animal clonado viável e que mais comumente se constituem em barreiras ao sucesso na clonagem são discutidas abaixo. As Etapas 1, 2 e 3 ocorrem na Fase Embrionária, a Etapa 4 na Fase Fetal, enquanto que a Etapa 5 é inexoravelmente uma manifestação pós-natal dos eventos do período pré-natal.

Etapa 1: Produção in vitro de embriões clones pela clonagem por TNCS

O processo de clonagem animal por TNCS, apesar de conceitualmente simples, envolve múltiplas etapas que tornam o processo bastante complexo, sendo este o marco inicial e mais representativo do sucesso ou das falhas no desenvolvimento subsequente. Esta etapa normalmente converge (a) os processos de obtenção de oócitos e maturação *in vitro* (MIV), reconstrução embrionária propriamente dita, e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até estádios embrionários transferíveis (normalmente embriões no estágio de blastocisto); e (b) os processos de preparação e uso de cultivos *in vitro* de células somáticas selecionadas como doadoras de núcleo. Algumas destas etapas, como a MIV de oócitos ou o CIV de embriões, são comuns a outros procedimentos de produção *in vitro* (PIV) de embriões, como a FIV. Porém, outras etapas são exclusivas à clonagem, como àquelas que substituem a fecundação pela TNCS. Estas incluem características e processos associados à fonte, qualidade e preparo do citoplasma receptor enucleado

(citoplasto) e da célula doadora de núcleo (carioplasto), e também da TNCS propriamente dita pela fusão de membranas plasmáticas e ativação embrionária (Campbell et al., 2005; Wells, 2010). Portanto, os aspectos intrínsecos que caracterizam os citoplastos e os carioplastos também são modulados pela influência físico-química e mecânica da preparação do material biológico, incluindo a manipulação e exposição ao ambiente *extra corpus*, sempre sub-ótimo e biologicamente menos adequado. Assim, nosso papel na clonagem é buscar maximizar as chances de reprogramação do carioplasto pelo uso de carioplastos mais reprogramáveis e citoplastos mais competentes, por meio de metodologias laboratoriais mais fisiológicas e menos agressivas. Como um espectro, o somatório destas características gradua o nível de reprogramação epigenética do genoma doador que determinarão o sucesso ou a falha da clonagem animal (Schurmann et al., 2006; Gao et al., 2007).

(i) Origem do citoplasto. O citoplasto é um fator limitante para muitas espécies, como a caprina e equina, em termos de disponibilidade, qualidade e competência biológica, sendo também uma das principais fontes de variação em programas de produção *in vitro* de embriões (Galli et al., 2003; Wells, 2010). Oócitos de MIV são rotineiramente utilizados com sucesso como fontes competentes de citoplasto para a realização da clonagem na maioria das espécies animais, apesar de oócitos maturados *in vivo* serem presumivelmente mais competentes para a reprogramação nuclear e para o suporte ao desenvolvimento embrionário subsequente (Campbell et al., 2005; Ribeiro et al., 2009; Wells, 2010; Mezzalira et al., 2011).

O citoplasto parece ser um dos pontos-chave do sucesso da clonagem, uma vez que tudo o que está associado ao oócito, exceto o DNA genômico, é essencial para o desenvolvimento embrionário e fetal subsequente. Os fatores de reprogramação, por exemplo, devem estar presentes de forma suficiente para reprogramar um genoma que está permissivo de ser reprogramado (Campbell et al., 2001; Oback & Wells, 2003). Acredita-se que a capacidade de reprogramação nuclear esteja em seu pico máximo em função do citoplasma do oócito conter fatores de remodelação e reprogramação da cromatina (proteínas, mRNAs, microRNAs e precursores moleculares) acumulados durante a foliculogênese, todos necessários para a reprogramação e desenvolvimento embrionário, pelo menos até a ativação do genoma embrionário (Alberio et al., 2001;

Gao et al., 2007). Não obstante, os fatores que atuam na reprogramação do núcleo doador ainda não estão completamente identificados, sendo a qualidade do oócito de suma importância para o sucesso da clonagem animal (Schurmann et al., 2006; Gao et al., 2007; Wells, 2010).

(ii) Célula doadora de núcleo. A escolha do carioplasto ou do tipo de célula doadora de núcleo é talvez o ponto de maior impacto biológico na clonagem, sendo responsável por grandes variações nas taxas de sucesso (Campbell et al., 2005). A eficiência de reprogramação da célula doadora após a TNCS parece depender de uma multitude de fatores, incluindo o genótipo (espécie, raça, sexo, idade, fator individual, etc.), a fase do desenvolvimento (embrião, feto, animal adulto), a origem tecidual, o tipo celular, o grau de diferenciação, o ciclo celular, e as características quando em cultivo (Wells et al., 2003; Batchelder et al., 2005; Hochedlinger & Jaenisch, 2002, 2006; Oback & Wells, 2007; Wells, 2010). Um dos paradigmas atuais preconiza que a maior eficiência da clonagem encontra-se associada à utilização de células somáticas sincronizadas no estágio G0 ou G1 do ciclo celular (Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998; Wells et al., 2003; Wells, 2010). Igualmente, células de origem embrionária parecem apresentar um potencial de desenvolvimento maior e nível de anormalidades menor do que células de origem fetal, as quais, por sua vez, parecem apresentar-se mais eficientes do que células de origem adulta (Heyman et al., 2002; Batchelder et al., 2005; Hochedlinger & Jaenisch, 2002, 2006). Células de um mesmo indivíduo, mas de distintas origens teciduais, em distintos níveis de diferenciação, também apresentam resultados em favor do menor grau de diferenciação (Batchelder et al., 2005). Da mesma forma, o método de isolamento, o tipo de cultivo celular e o número de passagens celulares podem exercer um efeito importante nos resultados da clonagem (Oback & Wells, 2007; Wells, 2010), sendo que células com poucas passagens em cultivo apresentam uma maior eficiência de reprogramação epigenética após a clonagem (Powell et al., 2004). Todos estes aspectos devem ser cuidadosamente controlados, pois se sabe que as condições de cultivo podem causar instabilidade genômica e, conseqüentemente, falhas na clonagem (Humpherys et al., 2001). Ainda assim, pelo número reduzido de nascimentos relatados nas distintas publicações, pela inexistência de estudos amplos controlados, e pela baixa eficiência da técnica, torna-se sempre difícil a comparação adequada entre tipos

celulares na clonagem por TNCS (Tecirlioglu et al., 2005).

(iii) Método de clonagem para a reconstrução embrionária por TNCS. A reconstrução embrionária propriamente dita pode ser realizada por micromanipulação com (Wilmut et al., 1997) ou sem (Oback & Wells, 2003) zona pelúcida, ou manualmente por handmade cloning (HMC), sem zona pelúcida (Peura et al., 1998; Vajta et al., 2003), não havendo diferenças aparentes quanto à eficiência final entre os procedimentos (Tecirlioglu et al., 2005). De modo geral, a reconstrução embrionária por TNCS envolve as etapas de enucleação oocitária, fusão de membranas/união de citoplasmas distintos, ativação oocitária e CIV dos embriões. A enucleação oocitária pode resultar em perda de citoplasma, que se excessiva, pode comprometer o desenvolvimento embrionário subsequente (Peura et al., 1998; Ribeiro et al., 2009). Por outro lado, a fusão das membranas das células leva ao mosaicismo e à heteroplasmia citoplasmática, pela união de distintos citoplasmas, não estando ainda claras quais as consequências biológicas no desenvolvimento posterior (Vajta et al., 2005; Ribeiro et al., 2009). Em adição, a fusão visa a introdução de um núcleo doador, normalmente nas fases G0/G1 do ciclo celular, em um oócito na fase M. Isto expõe o núcleo/cromatina a fatores de reprogramação e a proteínas e microRNAs heterólogos, supostamente importantes para a reprogramação do genoma (Alberio et al., 2001), sendo esta a importância do intervalo de tempo “fusão-ativação”, que também é chamado de tempo de reprogramação. Porém, o período de tempo ideal necessário para permitir o início da reprogramação do genoma ainda é indefinido e controvertido (Campbell, 2002). A ativação oocitária também parece estar relacionada a possíveis problemas de desenvolvimento, visto que, fisiologicamente, a ativação do oócito ocorre por ação de fatores liberados pelo espermatozóide, que provocam oscilações de cálcio intracelular no oócito por determinado período de tempo (Galli et al., 2003). Na TNCS, a ativação do embrião reconstruído pode ser induzida por pulso elétrico ou por ativação química, levando à elevação do cálcio intracelular em um pico único, fazendo-se necessário o uso de inibidores de proteínas quinases ou da síntese protéica para viabilizar o desenvolvimento embrionário (Fissore et al., 2002; Campbell et al., 2005). Por fim, o sistema de cultivo *in vitro* também tem sido associado a alterações epigenéticas que resultam em padrões distintos de expressão gênica em

embriões e células-tronco embrionárias (Dean et al., 1998; Wrenzycki et al., 1999, 2001).

Coletivamente, os fenômenos acima são apenas fragmentos de um amplo espectro de eventos biológicos que demonstram a complexidade dos processos celulares e moleculares que ainda necessitam ser elucidados na clonagem. Uma vez dominada a metodologia e compreendidos os fatores biológicos básicos, a obtenção de blastocistos é algo relativamente fácil de ser alcançado na clonagem. Porém, a produção de blastocistos não é um sinônimo de sucesso. Um exemplo disto é a obtenção de elevadas taxas de blastocistos por partenogênese, técnica comumente utilizada para inferir a qualidade oocitária (Ribeiro et al., 2009). Desta forma, apesar desta etapa ser um “gargalo” de fácil superação, a comprovação do sucesso no desenvolvimento *in vitro* somente pode ser atestado quando há indícios de desenvolvimento *in vivo* subsequente, após a transferência de embriões (TE) para fêmeas receptoras.

Etapa 2: Estabelecimento de prenhez após a transferência de embriões (TE)

Esta etapa também depende muito de aspectos extrínsecos e ambientais, como a necessidade do domínio técnico dos processos biológicos e reprodutivos que envolvem a seleção de fêmeas receptoras, a manipulação dos ciclos estrais, e de habilidades técnicas específicas, como a TE propriamente dita, normalmente realizada no Dia 7 de desenvolvimento, após CIV dos embriões. Porém, dominados os fatores técnico-biológicos acima, o sucesso nesta etapa depende por sua vez de aspectos intrínsecos dos embriões clonados, relacionados à viabilidade dos embriões transferidos. O sucesso nesta etapa, entretanto, está relacionado não somente ao estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica embrionária, mas fundamentalmente ao padrão de reprogramação nuclear obtido após a reconstrução pela clonagem que seja permissiva de uma expressão temporal e/ou espacial de genes importantes para os eventos biológicos associados ao desenvolvimento na fase embrionária pré-implantacional (Li et al., 2005; Arnold et al., 2006; Yang et al., 2005, 2007), que incluem a eclosão, a expansão em diâmetro, o alongamento físico mínimo do trofoblasto que permita o bloqueio fisiológico à luteólise, a formação e desenvolvimento do disco embrionário e da morfogênese, com a gastrulação, neurulação e início da formação das membranas

extra-embrionárias (Sloss & Dufty, 1980; Guillomot et al., 1993; Schläfer et al., 2000). Falhas, assincronias ou atrasos em quaisquer destes processos temporalmente importantes normalmente são letais e levam à mortalidade embrionária precoce (Bertolini et al., 2002ab), com as fêmeas receptoras retornando ao estro em período regular do ciclo estral (18 a 24 dias), ou por vezes tardia, quando antes da certificação por diagnóstico de gestação, com retornos ao estro em intervalo irregular (25 a 37 dias). Um leve retardo no desenvolvimento embrionário nesta etapa pode levar à falha de bloqueio à luteólise, mesmo com a presença *in utero* de um conceito viável, inviabilizando a continuidade da gestação. De fato, demonstrou-se que conceitos de FIV e clones podem apresentar um retardo no crescimento nesta fase, com um sub-desenvolvimento do trofoblasto em diferentes espécies (Hill et al., 2000; Bertolini et al., 2002b; Jouneau et al., 2006; Martin et al., 2007), o que pode reduzir as chances de manutenção de gestação.

Nesta etapa, quando todos os processos extrínsecos básicos estão padronizados, as taxas de prenhez normalmente indicam o potencial de desenvolvimento intrínseco dos embriões clones, com elevadas taxas de prenhez (compatíveis com embriões produzidos *in vivo*) sendo facilmente atingíveis e muitas vezes até mais elevadas do que para embriões derivados de FIV (dados não publicados). Por outro lado, baixas taxas de prenhez com embriões clones, independente da qualidade morfológica, são indicativas de problemas inerentes à Etapa 1 (procedimentos e/ou qualidade biológica dos citoplastos e carioplastos, reprogramação epigenética). A transposição desta etapa, portanto, depende de múltiplos fatores, com o legado da reprogramação epigenética da Etapa 1 exercendo um papel fundamental no desenvolvimento *in vivo* subsequente.

Etapa 3: A metamorfose do conceito – do embrião ao feto

Esta etapa envolve os processos morfo-fisiológicos talvez mais complexos de todo o desenvolvimento e que dependem de aspectos intrínsecos do conceito. Nesta etapa, que ocorre durante o período de implantação, a placentação e a organogênese são os maiores eventos fisiológicos, cujas falhas podem ser letais (Bertolini et al., 2007). Até o início desta fase, o conceito se desenvolve em um ambiente de relativo baixo nível de oxigênio (Guillomot et al., 1993), fazendo uso prioritariamente da glicólise anaeróbica para a geração de ATP. Porém, com o início da transformação explosiva da

organogênese, a demanda por O₂ e substratos e a necessidade de eliminação de metabólitos aumentam consideravelmente, o que é atendido pelo processo gradual da implantação e placentação, que precede o desenvolvimento embrionário e fetal (Prior & Laster, 1979). A possibilidade de controle técnico sobre o desenvolvimento neste período já não é possível, com a sobrevivência dependendo intrinsecamente do conceito. Esta é a fase de maior perda após a clonagem (Hill et al., 2002), podendo-se atingir índices de 40 a 100% (Wells et al., 1999; Hill et al., 2000; Heyman et al., 2002; Batchelder et al., 2005), dependendo de fatores como os já discutidos acima para a Etapa 1.

Em bovinos, demonstrou-se nesta etapa de desenvolvimento que embriões e fetos iniciais derivados de embriões de FIV e da clonagem por TNCS podem ser menores que o normal, sendo esta a manifestação da primeira fase de um padrão bifásico de crescimento durante a gestação (Bertolini et al., 2002a; Chavatte-Palmer et al., 2006). Este fenômeno de crescimento bifásico não é somente limitado ao embrião, afetando também o desenvolvimento das membranas embrionárias, a placentação e a sobrevivência subsequente (Hill et al., 2000; Bertolini et al., 2002a). Desta forma, é improvável que o padrão fenotípico acima seja decorrente de falhas na organogênese, mas possivelmente causado por uma implantação ou placentação inadequada (Hill et al., 2000, 2002; DeSouza et al., 2001; Hashizume et al., 2002). Semelhante ao processo de reconhecimento materno, o processo de placentação deve ocorrer em uma “janela biológica” estreita (~Dias 17 a 35 de prenhez), com falhas podendo levar ao retardo de desenvolvimento e à morte do conceito (Bertolini et al., 2002a). O sub-desenvolvimento do trofoblasto, a regressão precoce do saco vitelínico e/ou o atraso no desenvolvimento do alantóide podem retardar a implantação e a placentação, podendo ser letal se o limiar para a sobrevivência não for alcançado (Bertolini et al., 2007). Se não houver, então, um desenvolvimento espacial e temporal de formação da placenta, o embrião pode entrar em hipóxia e acumular resíduos do metabolismo, levando à morte embrionária tardia, não chegando à fase fetal. Os conceitos que sobrevivem à fase fetal podem, por conseguinte, ser menores no início da fase fetal. Assim, anormalidades gestacionais durante esta etapa podem ser manifestações de inadequado desenvolvimento das membranas extra-embrionárias e da placenta, por distúrbios na

implantação e/ou placentação, o que pode determinar o aparecimento de distintos fenótipos no desenvolvimento na fase fetal (Etapa 4).

Etapa 4: Fase fetal

A quarta etapa é a fase de crescimento e maturação do feto e da placenta, com a intervenção clínica e influência técnica sendo, nessa fase, extremamente restrita. Após o período crítico de sobrevivência durante a restrição ao crescimento observada no final da fase embrionária e início da fase fetal, os fetos sobreviventes passam por um período de rápido crescimento compensatório após os 60 dias de prenhez (Bertolini et al., 2002a; Chavatte-Palmer et al., 2006). Este fenômeno é precedido por mudanças no padrão de desenvolvimento da placenta que parecem restaurar o tamanho fetal no final do primeiro trimestre de prenhez (Bertolini et al., 2002a; 2004; Batchelder et al., 2005). Porém, a compensação placentária ao retardo de desenvolvimento leva à aceleração do crescimento fetal no segundo e terceiro trimestres de gestação, possivelmente pela perda da capacidade de controle placentário de crescimento fetal, levando ao gigantismo fetal (Bertolini et al., 2002a; Lee et al., 2004; Batchelder et al., 2005; Constant et al., 2006). Tais eventos podem culminar com a morte fetal ou com o nascimento de bezerros maiores, de menor viabilidade, e com placentas e membranas fetais morfológicamente alteradas (Bertolini et al., 2002a; 2004; Batchelder et al., 2005).

Também são comuns nesta fase os problemas de função placentária, incluindo a insuficiência placentária e as hidropsias das membranas fetais, como o hidroalantóide, que podem levar a perdas pré-natais (Li et al., 2005; Constant et al., 2006; Farin et al., 2006). Nesta fase também se manifestam, com frequência, gestação prolongada, sinais de falhas de preparação da fêmea gestante para o parto e, indiretamente, de maturação do feto para o nascimento. Porém, muitos dos fenômenos nesta fase são meros reflexos metabólicos, fisiológicos e morfológicos das anormalidades que se iniciam com uma reprogramação inadequada na Etapa 1, e que se traduzem em uma placentação (Etapa 3) e programação metabólica (Etapa 4) anormais. A biodisponibilidade de certos substratos e hormônios durante a prenhez é importante para o estabelecimento de padrões normais de atividade nos sistemas fisiológicos do conceito, um fenômeno comumente chamado de programação metabólica (McMillen & Robinson, 2005). De acordo com esta teoria, mudanças no padrão de suprimento de substratos ao feto podem conduzir a

modificações moleculares e celulares permanentes na atividade de órgãos e sistemas que podem persistir por toda a vida do indivíduo, gerando o conceito da origem fetal para as doenças na fase adulta (Bertram & Hanson, 2001), também conhecido como a Hipótese de Barker (Barker, 1999). Por conseguinte, não necessariamente há a continuidade de padrões distintos de expressão gênica em tecidos fetais ou placentários nessa fase, podendo os distintos fenótipos serem manifestações de uma cascata de eventos morfo-fisiológico-metabólicos inicializados por padrões anormais transientes de expressão de genes importantes para as etapas iniciais de desenvolvimento do concepto (Jiang et al., 2011). Não obstante, as perdas nesta fase não são muito mais significativas do que gestações com conceptos derivados de embriões produzidos *in vivo*, mas os sinais clínicos e fenotípicos no período podem sempre fornecer evidências ou indícios dos possíveis sinais clínicos e fenotípicos que poderão aparecer na Etapa 5, após o nascimento.

Etapa 5: Sobrevivência pós-natal

A quinta etapa é também considerada um dos principais “gargalos” na clonagem, havendo problemas de distocia e alta morbidade e mortalidade pós-natais por problemas clínicos cardio-respiratórios, gastrintestinais, músculo-esqueléticos, hematológicos, imunológicos, neurológicos, e de manutenção de mecanismos homeostáticos, entre outros (Garry et al., 1996; Hill & Chavatte-Palmer, 2002; Chavatte-Palmer et al., 2004; Wells et al., 2004; Batchelder et al., 2007ab). Apesar do esforço da comunidade científica e profissional em reduzir as perdas pós-natais em clones, a mortalidade perinatal de clones ainda é elevada (Hill & Chavatte-Palmer, 2002). Em ovinos, a mortalidade no período neonatal hebdomadal pode chegar a 80% (Loi et al., 2006).

Durante o desenvolvimento, na medida em que o embrião se transforma em feto, os tecidos e sistemas no organismo vão sendo fisiologicamente “testados” ao haver a necessidade de que suas funções se inicializem e se consolidem para a manutenção da homeostasia. Modificações morfo-fisiológico-metabólicas que porventura se estabeleçam no início do desenvolvimento até o final da fase fetal poderão, portanto, manifestar-se mais marcadamente após o nascimento (Bertolini et al., 2004). Sistemas que não são submetidos ao “teste de funcionalidade” antes do nascimento, seja parcial

ou total, como os sistemas respiratório, gastrointestinal, termoregulatório, ou mesmo imunológico, os quais devem ajustar-se rapidamente a um ambiente *ex utero* agressivo e muito distinto do ambiente uterino (já na atmosfera), podem demonstrar falhas em diversos níveis após o parto, exigindo a hábil atenção e intervenção técnica em procedimentos em neonatologia (Hill & Chavatte-Palmer, 2002). Destes, há sistemas no organismo de clones que se ajustam e normalizam as atividades para o controle da homeostase, muitas vezes mesmo sem a necessidade de intervenção clínica. Porém, há sistemas que não atingem o nível de ajuste necessário, levando à morte do animal, principalmente no período neonatal hebdomadal imediato, sendo esta uma das maiores causas de óbito nos clones, em especial nas primeiras 72 h, com uma maior tendência à morte até os 60 dias de vida (Wells et al., 2004), havendo também uma maior mortalidade até a fase adulta (Rudenko et al., 2004). A morbidade e mortalidade pós-natal, portanto, parecem estar relacionadas a falhas em sistemas ou órgãos vitais que não se adaptam suficientemente ao ambiente externo após o nascimento.

O reconhecimento de padrões de falhas fisiológicas nesta fase, se possível, poderá auxiliar na modulação dos processos de preparação e manipulação de citoplastos, carioplastos e embriões na Etapa 1 que promovam uma reprogramação do núcleo doador com padrões epigenéticos mais completos e permissivos à normalidade da morfogênese, placentação e organogênese. Por sua vez, esta “normalização” morfo-fisiológica inicial repercutir-se-á em conceitos com padrões normais de desenvolvimento que permitirão o nascimento de animais clones mais completos e mais aptos à sobrevivência pós-natal, o que sumariza o sucesso no “pentatlo embrionário” da clonagem animal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O somatório dos eventos e processos intrínsecos e extrínsecos resultantes da produção *in vitro* de embriões clones (Etapa 1) determinarão, em grande parte, o sucesso nas etapas subsequentes, com a metamorfose embrionário-fetal (Etapa 3) e a sobrevivência pós-natal (Etapa 5) sendo os maiores “gargalos” na clonagem animal, dependente de eventos biológicos e técnicos impostos na Etapa 1. Enquanto os aspectos extrínsecos são determinantes nas Etapas 1 e 2, as Etapas 3 e 4 estão sob controle

eminentemente intrínseco do conceito. Por esta razão, é a grande dependência do ambiente externo, menos mutável e adaptável para a sobrevivência, que determina as maiores perdas gestacionais e neonatais observadas nas Etapas 3 e 5. Se por um lado, o suporte à organogênese depende da necessidade de placentação adequada para as trocas diretas com o sistema materno (Etapa 3), por outro, o meio ambiente e os elementos climáticos, após o nascimento, impõem a necessidade de adaptação à vida *ex utero* (Etapa 5). As características fenotípicas e fisiológicas nessas etapas serão, em grande parte, um reflexo direto do sucesso da reconstrução embrionária e subsequente reprogramação epigenética no embrião na primeira semana de vida.

Considera-se que quanto mais completa for a reprogramação, mais avançado será o curso de desenvolvimento dos indivíduos clonados. Por outro lado, quanto maiores às falhas de reprogramação, mais precoces serão as perdas e mais aberrantes serão os fenótipos. Não obstante, as falhas de reprogramação podem advir de distintas fontes, como a origem dos oócitos, o tipo de célula somática, os procedimentos de manipulação dos oócitos e das células, e da reconstrução e produção *in vitro* dos embriões, podendo todos interagir para o aparecimento de falhas ou para o sucesso final. Neste sentido, falhas de reprogramação epigenética em decorrência da clonagem podem determinar mudanças de expressão gênica que se manifestam, em um “efeito dominó”, como modificações morfo-fisiológico-metabólicas estabelecidas principalmente na placenta, iniciadas na fase embrionária e perpetuadas e intensificadas na fase fetal e após o nascimento. O grau de alterações estabelecido no início da gestação, portanto, irá ditar a intensidade dos problemas subsequentes, o que, por sua vez, poderá induzir mudanças na programação metabólica pré-natal, a qual poderá afetar a função placentária, causar efeitos no crescimento do conceito, alterar eventos no periparto, e comprometer a sobrevivência até a fase adulta. Desta maneira, a caracterização de cada fenótipo poderá auxiliar no entendimento dos fatores extrínsecos e intrínsecos associados às mudanças epigenéticas nos primeiros dias de vida e que afetam a vida pós-natal.

Em suma, a melhor compreensão e domínio dos eventos técnicos e biológicos, especialmente a reconstrução e produção *in vitro* de embriões clonados (Etapa 1), estão diretamente relacionados à eficiência final da clonagem animal. Ademais, a compreensão de mecanismos de anormalidade ao longo de cada etapa poderá fornecer

informações relevantes sobre eventos fisiológicos (por ex., placentação) ou patológicos (por ex., mortalidade embrionária) que ocorrem na natureza, que se traduzidos para aplicações na produção animal, poderão ter um impacto científico e econômico considerável. Em seu final, o sucesso na clonagem animal não somente depende da sobrevivência dos animais mais aptos e completos em termos epigenéticos, moleculares e morfo-fisiológico-metabólicos. O componente técnico também exerce papel fundamental, já que a clonagem por TNCS somente existe pelo exercício da mão do homem, dependendo do conhecimento integrado e do domínio exímio da fisiopatologia e das biotécnicas da reprodução animal, da biologia celular, molecular e bioquímica, da embriologia, obstetrícia e neonatologia, do diagnóstico por imagem e da clínica médica e cirúrgica, entre outras disciplinas e áreas de conhecimento complementares. Desta forma, o sucesso na clonagem também depende dos mais aptos e completos em termos técnicos. Porém, a eficiência geral da clonagem por TNCS ainda permanece baixa (1 a 5%), demonstrando, estatisticamente, que o “normal” ainda é o insucesso (95 a 99%). Assim, os “mais aptos e completos” ainda têm muito a evoluir biológica e tecnicamente para atingirem pelo menos a “tendência” de serem considerados eficientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERIO, R.; BRERO, A.; MOTLIK, J.; CREMER, T.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V. Remodeling of donor nuclei, DNA synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *Molecular Reproduction and Development*, v.59, p.371-379, 2001.

[ARNOLD, D.R.](#); [BORDIGNON, V.](#); [LEFEBVRE, R.](#); [MURPHY, B.D.](#); [SMITH, L.C.](#) Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*, v.132, p.279-290, 2006.

BARKER, D.J.P. Fetal programming and public health. In: O'Brien PMS, Wheeler T & Barker DJP (eds). *Fetal Programming: Influences on Development and Disease in Later Life*. London: RCOG Press, p.3-11., 1999.

[BATCHELDER, C.A.](#); [HOFFERT, K.A.](#); [BERTOLINI, M.](#); [MOYER, A.L.](#); [MASON, J.B.](#); [PETKOV, S.G.](#); [FAMULA, T.R.](#); [ANDERSON, G.B.](#) Effect of the nuclear-donor

cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. [Cloning & Stem Cells](#), v.7, p.238-254, 2005.

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

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

BERTOLINI, M.; BEAM, S.W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L.R.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; ANDERSON, G.B. Growth, development and gene expression by in vivo- and in vitro-produced Day-7 and Day-16 bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v.63, n.3, p.318-328, 2002a.

BERTOLINI, M.; MASON, J.B.; BEAM, S.W.; CARNEIRO, G.F.; SWEEN, M.L.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; SAINZ, R.D.; ANDERSON, G.B. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology*, v.58, n.1, p.973-994, 2002b.

BERTOLINI, M.; MOYER, A.L.; MASON, J.B.; BATCHELDER, C.A.; HOFFERT, K.A.; BERTOLINI, L.R.; CARNEIRO, G.F.; CARGILL, S.L.; FAMULA, T.R.; CALVERT, C.C.; SAINZ, R.D.; ANDERSON, G.B. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine fetuses and association with accelerated conceptus growth. *Reproduction*, v.128, n.3, p.341-354, 2004.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R.; GERGER, R.P.C.; BATCHELDER, C.A.; ANDERSON, G.B. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.391-405, 2007.

BERTRAM, C.A.; HANSON, M.A. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *British Medical Bulletin*, v.60 p.103-121, 2001.

CAMPBELL, K.H.S.; ALBERIO, R.; LEE, J.H.; RITCHIE, W.A. Nuclear transfer in practice. *Cloning & Stem Cells* v.3, p.201-208, 2001.

CAMPBELL, K.H.S. Cell cycle regulation in cloning. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), Principles of Cloning. Academic Press San Diego, p.391-399, 2002.

CAMPBELL, K.H.S.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.D.W.; LEE, J.H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. *Reproduction of Domestic Animal* v.40, p.256–268, 2005.

[CHAVATTE-PALMER, P.](#); [REMY, D.](#); [CORDONNIER, N.](#); [RICHARD, C.](#); [ISSENMAN, H.](#); [LAIGRE, P.](#); [HEYMAN, Y.](#); [MIALOT, J.P.](#) Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning & Stem Cells*, v.6, n.2, p.94-100, 2004.

[CHAVATTE-PALMER, P.](#); [DE SOUSA, N.](#); [LAIGRE, P.](#); [CAMOUS, S.](#); [PONTER, A.A.](#); [BECKERS, J.F.](#); [HEYMAN, Y.](#) Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*, v.66, n.4, p.829-840, 2006.

HUBBERT, W.T. Committee on Bovine reproductive nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet* 1972; 62:216-236.

CONSTANT, F.; [GUILLOMOT, M.](#); [HEYMAN, Y.](#); [VIGNON, X.](#); [LAIGRE, P.](#); [SERVELY, J.L.](#); [RENARD, J.P.](#); [CHAVATTE-PALMER, P.](#) Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biology of Reproduction*, v.75, n.1, p.122-130, 2006.

DEAN, W.; BOWDEN, L.; AITCHISON, A.; KLOSE, J.; MOORE, T.; MENESES, J.J.; REIK, W.; FEIL, R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development*, v.125, p.2273-2282, 1998.

DESOUZA, P.A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L.E.; WALKER, S.K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biology of Reproduction*, v.65, n.1, p.23-30, 2001.

FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.65, n.1, p.178-191, 2006.

- FISSORE, R.A.; SMYTH, J.; KUROKAWA, M.; COLLAS, P. Activation of mammalian oocytes. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), Principles of Cloning. Academic Press San Diego, p.1-45, 2002
- GALLI, C.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Introduction to cloning by nuclear transplantation. Cloning & Stem Cells v.5, p.223-232, 2003
- GAO, T.; ZHENG, J.; XING, F.; FANG, H.; SUN, F.; YAN, A.; GONG, X.; DING, H.; TANG, F.; SHENG, H.Z. Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. Cellular Research, v.17, p.135-150, 2007.
- GARRY, F.B.; ADAMS, R.; MCCANN, J.P.; ODDE, K.G. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenology, v.45, n.1, p.141-152, 1996.
- GUILLOMOT, M.; FLÉCHON, J.E.; LEROY, F. Blastocyst development and implantation. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF. (eds). Reproduction in Mammals and Man. Paris: Ellipses, p.387-411, 1993.
- HASHIZUME, K.; ISHIWATA, H.; KIZAKI, K.; YAMADA, O.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, O.V.; AKAGI, S.; SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, S.; KATSUMA, S.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TSUJIMOTO, G.; TODOROKI, J.; IZAIKE, Y. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. Cloning & Stem Cells, v.4, p.197-209, 2002.
- HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. Biology of Reproduction, v.66, p.6-13, 2002.
- HILL, J.R.; CHAVATTE-PALMER, P. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds). Principles of Cloning. Amsterdam & others: Academic Press, p.247-266, 2002.
- HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K.; LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q.A.; WESTHUSIN, M.E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. Biology of Reproduction, v.63, p.1787-1794, 2000.
- [HILL, J.R.](#); [SCHLAFER, D.H.](#); [FISHER, P.J.](#); [DAVIES, C.J.](#) Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine

pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. [Biology of Reproduction](#), v.67, n.1, p.55-63, 2002.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Current Opinion in Cell Biology* v.14, p.741-748, 2002.

[HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R.](#) Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, v.441, n.7097, p.1061-1067, 2006.

HUMPHERYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, I.I.I. W.M.; BINISZKIEWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, v.293, p.95-97, 2001.

JIANG, L.; MARJANI, S.L.; BERTOLINI, M.; ANDERSON, G.B.; YANG, X.; TIAN, X.C. Indistinguishable transcriptional profiles between in vitro- and in vivo-produced bovine fetuses. *Molecular Reproduction and Development*, v.78, p.42-650, 2011.

[JOUNEAU, A.; ZHOU, Q.; CAMUS, A.; BROCHARD, V.; MAULNY, L.; COLLIGNON, J.; RENARD, J.P.](#) Developmental abnormalities of NT mouse embryos appear early after implantation. [Development](#), v.133, n.8, p.1597-1607, 2006.

[LEE, R.S.; PETERSON, A.J.; DONNISON, M.J.; RAVELICH, S.; LEDGARD, A.M.; LI, N.; OLIVER, J.E.; MILLER, A.L.; TUCKER, F.C.; BREIER, B.; WELLS, D.N.](#) Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. [Biology of Reproduction](#), v.70, n.1, p.1-11, 2004.

[LEISER, R.; KAUFMANN, P.](#) Placental structure: in a comparative aspect. [Experimental and Clinical Endocrinology](#), v.102, n.3, p.122-134, 1994.

[LI, S.; LI, Y.; DU, W.; ZHANG, L.; YU, S.; DAI, Y.; ZHAO, C.; LI, N.](#) Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. [Biology of Reproduction](#), v.72, n.2, p.258-265, 2005.

[LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FULKA, J. JR.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; SALDA, L.D.; PTAK, G.](#) Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. [Theriogenology](#), v.65, n.6, p.1110-1121, 2006.

[MARTIN, L.; BESCH-WILLIFORD, C.; LAI, L.; CHEONG, H.T.; IM, G.S.; PARK, K.W.; MURPHY, C.; HAO, Y.; ELLERSIECK, M.R.; KEISLER, D.H.; SCHATTEN, H.; GREEN, J.A.; PRATHER, R.S.](#) Morphologic and histologic comparisons between

in vivo and nuclear transfer derived porcine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v.74, p.952-960, 2007.

MCMILLEN, C.I.; ROBINSON, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiology Reviews*, v.85, p.571-633, 2005.

OBACK, B.; WELLS, D.N. Cloning cattle. *Cloning & Stem Cells*, v.5, p.243-256, 2003.

OBACK, B.; WELLS, D.N. Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Molecular Reproduction and Development*, v.74, p.646–654, 2007.

PEURA, T.T.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, v.50, p.185-191, 1998.

POWELL, A.M.; TALBOT, N.C.; WELLS, K.D.; KERR, D.E.; PURSEL, V.G.; WALL, R.J. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, v.71, p.210-216, 2004.

PRIOR, R.L.; LASTER, D.B. Development of the bovine fetus. *Journal of Animal Science*, v.48, p.1546-1553, 1979.

RIBEIRO, E.S.; [GERGER, R.P.C.](#); [OHLWEILER, L.U.](#); ORTIGARI I, J.R.; [MEZZALIRA, J.C.](#); [FORELL, F.](#); [BERTOLINI, L.R.](#); [RODRIGUES, J.L.](#); [AMBROSIO, C.E.](#); [MIGLINO, M.A.](#); [MEZZALIRA, A.](#); BERTOLINI, M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning & Stem Cells*, v.11, p.377-386, 2009.

[RUDENKO, L.](#); [MATHESON, J.C.](#); [ADAMS, A.L.](#); [DUBBIN, E.S.](#); [GREENLEES, K.J.](#) [Links](#) Food consumption risks associated with animal clones: what should be investigated? *Cloning & Stem Cells*, v.6, n.2, p.79-93, 2004.

SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.145-160, 2000.

- SCHURMANN, A.; WELLS, D.N.; OBACK, B. Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring. *Reproduction*, v.132, p.839–848, 2006.
- SLOSS, V.; DUFTY, J.H. *Handbook of Bovine Obstetrics*. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1980.
- TECIRLIOGLU, R.T.; COONEY, M.A.; LEWIS, I.M.; KORFIATIS, N.A.; HODGSON, R.; RUDDOCK, N.T.; VAJTA, G.; DOWNIE, S.; TROUNSON, A.O.; HOLLAND, M.K.; FRENCH, A.J. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reproduction, Fertility and Development*, v.17, p.573-585, 2005.
- THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reproduction Nutrition Development* v.45, p.235–242, 2005.
- VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O.; PURUP, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SCHMIDT, M.; PEDERSEN, H.G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biology of Reproduction*, v.68, p.571-578, 2003.
- VAJTA, G.; KRUGH, P.M.; MTANGO, N.R.; CALLESEN, H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reproduction, Fertility and Development*, v.17, p.97-112, 2005.
- WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K.R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, v.394, p.369-374, 1998.
- WALKER, S.K.; HARTWICH, K.M.; SEAMARK, R.F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, v.45, p.111-120, 1996.
- WELLS, D.N. Nuclear transfer: the importance of donor and recipient cells for nuclear reprogramming and cloning efficiency in mammals. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.38, p.487-507, 2010.
- [WELLS, D.N.](#); [MISICA, P.M.](#); [TERVIT, H.R.](#) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.60, n.4, p.996-1005, 1999.

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

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

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

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

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*, v.65, p.309-317, 2001.

[YANG, L.](#); [CHAVATTE-PALMER, P.](#); [KUBOTA, C.](#); [O'NEILL, M.](#); [HOAGLAND, T.](#); [RENARD, J.P.](#); [TANEJA, M.](#); [YANG, X.](#); [TIAN, X.C.](#) Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Molecular Reproduction and Development*, v.71, n.4, p. 431-438, 2005.

[YANG, X.](#); [SMITH, S.L.](#); [TIAN, X.C.](#); [LEWIN, H.A.](#); [RENARD, J.P.](#); [WAKAYAMA, T.](#) Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics*, v.39, n.3, p.295-302, 2007.