

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DOADORAS DERIVADAS DA PELE PARA A TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

[Isolation and characterization of skin-derived donor cells for nuclear transfer]

Alexsandra Fernandes Pereira^{1*}, Magda Lorena Turbano dos Santos¹, Alana Azevedo Borges¹, Luiza Bento de Queiroz Neta¹, Maria Valéria de Oliveira Santos¹, Ana Kelly Nogueira Feitosa¹

¹Laboratório de Cultura Celular e Biotecnologia Animal, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. *Autor para correspondência: E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

RESUMO - O sucesso das biotecnologias reprodutivas assistidas, especialmente a clonagem por transferência nuclear de células somáticas, envolve múltiplos fatores e cada um destes pode influenciar a eficiência final. Em geral, os protocolos de isolamento, caracterização e criopreservação de células das espécies a serem clonadas constituem a etapa inicial para a obtenção de descendência clone viável, além de contribuir para outros estudos relacionados à biotecnologia celular. Neste contexto, o sucesso desta etapa pode ser alcançado pela associação da escolha do tipo celular, estabelecimento de altas taxas de viabilidade, atividade proliferativa e metabólica após o cultivo *in vitro* e criopreservação, além da sincronia do ciclo celular antes da reconstrução do embrião clone. Os fibroblastos e outras células derivadas da pele oriundas da região auricular de fetos ou animais adultos representam a fonte de fácil manipulação e mais adequada para a obtenção de carioplastos. Adicionalmente, avanços nesta área têm mostrado a possibilidade da produção de células pluripotentes a partir de células somáticas modificadas. Assim, o objetivo deste manuscrito é realizar uma revisão sobre os aspectos práticos da obtenção e estabelecimento de células doadoras de núcleo derivadas da pele para a reconstrução embrionária, descrevendo os fatores relacionados em cada procedimento que interferem no resultado final.

Palavras-Chave: fibroblastos; ciclo celular; criopreservação; clonagem.

ABSTRACT – The success of assisted reproductive biotechnology, especially cloning by somatic cell nuclear transfer, involves multiple factors and each of these may influence the final efficiency. In general, the protocols for the isolation, characterization and cryopreservation of cells of the species to be cloned consist in initial step for obtaining viable clone offspring, and contribute to other studies on cell biotechnology. In this context, the success of this step may be achieved by association of the choice of cell type, establishment of high rates of viability, metabolic and proliferative activities after *in vitro* culture and cryopreservation, and cell cycle synchronization prior to embryo reconstruction. Fibroblasts and other skin derived-cells from ear region of fetal or adult animals represent a source of easy handling and better appropriate for obtaining caryoplasts. Additionally, advances in this area are showing the possibility of induced pluripotent cells from modified somatic cells. Thus, the aim of this manuscript is to describe the practical aspects of obtaining and establishing skin-derived donor cells for embryo reconstruction, with emphasis to the factors listed in each procedure that affect the final outcome.

Keywords: fibroblasts; cell cycle; cryopreservation; cloning.

INTRODUÇÃO

Desde o nascimento do primeiro mamífero clone utilizando células epiteliais de uma ovelha adulta como doadoras de núcleo (Wilmut et al., 1997), a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tem se tornado uma biotecnologia com abrangência em diferentes setores científicos, produtivos e comerciais. Inicialmente, o propósito da TNCS ocorreu pela necessidade de conhecer o papel do material genético na diferenciação celular em anfíbios

(Speemann, 1938). Posteriormente, esta biotécnica foi aplicada com sucesso em diferentes espécies, incluindo animais de produção (bovinos: Cibelli et al., 1998; caprinos: Baguisi et al., 1999; suínos: Polejaeva et al., 2000), e desde então vem sendo aproveitada para a produção e multiplicação de animais biorreatores de proteínas recombinantes (antitrombina III humana: Baguisi et al., 1999; hormônio do crescimento humano: Salamone et al., 2006; butirilcolinesterase humana: Baldassarre et al., 2008; Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano, hG-CSF: Pereira et al., 2013)

e para a conservação e regeneração dos recursos genéticos (Wang et al., 2007; Folch et al., 2009).

Em geral, a TNCS é realizada de acordo com as seguintes etapas: (i) preparação de citoplastos receptores a partir da obtenção, seleção e maturação *in vitro* ou *in vivo* de oócitos; (ii) isolamento, caracterização, cultivo *in vitro* e sincronização do ciclo das células somáticas a serem utilizadas como doadoras de núcleo (carioplastos); (iii) reconstrução embrionária propriamente dita pela transferência de núcleo, fusão dos complexos carioplasto-citoplasto, ativação celular e desenvolvimento embrionário pre-implantacional *in vitro*; (iv) transferências de embriões para receptoras previamente sincronizadas; (v) estabelecimento das prenhez, desenvolvimento fetal e nascimento das crias. Em todas essas etapas, há fatores determinantes para o sucesso da técnica e a sincronia de todas as etapas estabelece o sucesso da produção de descendência de clones viáveis.

Contudo, a eficiência da clonagem por TNCS ainda é baixa, tendo um percentual inferior a 5% de embriões produzidos resultando em animais nascidos vivos (Bertolini et al., 2012). A origem da célula doadora de núcleo consiste na etapa crucial inicial para o sucesso da técnica em diferentes espécies, podendo ter efeitos importantes sobre a capacidade de desenvolvimento pre-implantacional *in vitro* de embriões clones reconstruídos, bem como sobre o crescimento/desenvolvimento fetal pós-implantação (Pereira & Freitas, 2009; Freitas et al., 2013).

Assim, esta revisão tem por objetivo descrever os critérios práticos de isolamento e estabelecimento de células doadoras de núcleo derivadas da pele, associando com os fatores que interferem no sucesso desta etapa, bem como as adaptações empregadas nos diferentes momentos de preparação celular que antecedem a reconstrução de embriões clones.

ESCOLHA DA CÉLULA DOADORA DE NÚCLEO

A origem do carioplasto e, conseqüentemente, sua escolha para a TNCS define-se como o fator de maior força biológica, que pode resultar em grandes variações nas taxas de sucesso da técnica (Bertolini et al., 2012). Isso ocorre por três principais razões consideradas imprevisíveis no momento da escolha das células doadoras de núcleo: (1) erros genéticos e epigenéticos no genoma doador; (2) reprogramação genética ou epigenética incompleta e (3) associação de ambas as razões (Oback & Wells, 2002). Por esses motivos e buscando sistemas padronizados, vários estudos têm sido empregados objetivando estabelecer, independente

da espécie, protocolos eficientes de obtenção, colheita e processamento inicial de tipos celulares específicos (Cetinkaya & Arat, 2011), caracterização dessas células (Dutta et al., 2011), métodos de sincronização no estágio de G0/G1 do ciclo celular (Gerger et al., 2010; Akshey et al., 2011) e criopreservação do material genético para a formação de criobancos, visando não somente a produção de crias clones (Cibelli et al., 1998; Baguisi et al., 1999; Folch et al., 1999; Salamone et al., 2006; Gambini et al., 2012) como a preservação genética da espécie pelo armazenamento seguro do seu material (Silvestre et al., 2004; Cetinkaya & Arat, 2011; León-Quinto et al., 2011; 2014).

A preparação das células doadoras de núcleo inicia com a escolha do tipo de célula do animal que se pretende clonar. Estudos demonstram que tipos celulares de diferentes tecidos e idade podem ser reprogramados, sendo relatado o nascimento de crias usando células embrionárias (Campbell et al., 1996), células somáticas fetais de cultivo primário derivadas de linhagem de um feto transgênico (Baguisi et al., 1999), fibroblastos fetais (Keefer et al., 2001), células do *cumulus* (Lan et al., 2006), células do epitélio ovidutário (Kato et al., 1998) e fibroblastos adultos da região auricular (Chen et al., 2007).

Além disso, carioplastos podem ser modificados geneticamente por diferentes técnicas de incorporação do DNA exógeno no interior do genoma da célula, permitindo a produção de células e animais transgênicos por TNCS usando diferentes tipos celulares transfectados (fibroblastos fetais: Keefer et al., 2002; células do *cumulus*: Wakayama et al., 1998; células musculares: Shiga & Oppenheim, 1999). Adicionalmente, células somáticas podem também serem modificadas com a finalidade de produção de células pluripotentes (Takahashi & Yamanaka, 2006), sendo denominadas de *induced pluripotent stem cells* (*iPS*). Fibroblastos modificados podem, por exemplo, diferenciar-se em gametas.

Contudo, independente da finalidade (produção de clones transgênicos vs. obtenção de clones vs. cultivo e caracterização de *iPS*), o modelo celular mais utilizado é fibroblastos obtidos de biópsias da pele de fetos ou animais adultos. Inúmeras razões justificam o uso dessas células como doadoras de núcleo para a reconstrução embrionária, como sua fácil obtenção e manipulação para o cultivo *in vitro*, seja cultivo primário ou subcultivos, padrões de congelamento e transfecção adequados, além da obtenção de quantidades inesgotáveis a partir de um único explante.

ASPECTOS PRÁTICOS PARA O ESTABELECIMENTO DE CÉLULAS DOADORAS DE NÚCLEO DERIVADAS DA PELE

A preparação dos carioplastos derivados de biópsias de pele envolve múltiplas etapas que incluem o isolamento a partir da colheita do material biológico, estabelecimento e caracterização celular a partir de cultivos primários e subcultivos, condições de criopreservação de populações celulares após os subcultivos e sincronização do ciclo das células doadoras antes da clonagem. A realização de todas essas etapas requer do operador além dos conceitos básicos de biologia celular, também conhecimentos das técnicas de cultivo celular *in vitro*, criopreservação e manipulação de fragmentos teciduais no momento da colheita, transporte e processamento dos explantes.

Obtenção de células derivadas da pele

As primeiras células isoladas e utilizadas para a clonagem foram blastômeros (Briggs & King, 1952), sendo facilmente isoladas de embriões produzidos por métodos *in vivo* e *in vitro*. Antes da compactação, blastômeros podem ser prontamente dissociados por processamento mecânico em meios livres de cálcio e magnésio (Oback & Wells, 2002). Posteriormente, com a obtenção do primeiro mamífero a partir de células fetais e adultas, numerosos estudos foram desenvolvidos evidenciando que células somáticas podem ser utilizadas como doadoras de núcleo. Em geral, essas células podem ser processadas diretamente após a colheita do animal a ser clonado (Galli et al., 1999) ou após um período de cultivo (Kubota et al., 2000), antes ou depois da criopreservação (Pereira et al., 2013; 2014).

Rotineiramente, carioplastos podem ser derivados de biópsias da pele da região auricular de animais adultos (Pereira et al., 2013) ou fetais (Pereira et al., 2014), de acordo com procedimentos padrões de limpeza e esterilização previamente estabelecidos (Ribeiro et al., 2009). Brevemente, uma biópsia de pele da região auricular é obtida assepticamente, realizando uma tricotomia no local seguida de assepsia com álcool a 70%. Com uso de tesoura cirúrgica, amostras com diâmetro de aproximadamente 0,25 cm² de comprimento por 1 mm de profundidade são coletadas e transportadas ao laboratório em solução tampão fosfato (PBS) ou solução fisiológica (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (80 mg/mL de estreptomicina e 80,000 UI/mL de penicilina), pH 7,4, a 37°C.

Em casos em que o material coletado será a partir de um animal *post-mortem*, o tempo entre a obtenção do material e a temperatura *post-mortem*

possibilita uma garantia no resgate de células viáveis (Silvestre et al., 2003), isto é, a informação sobre o tempo da morte do animal pode prever a avaliação da qualidade do tecido, permitindo maior viabilidade para os procedimentos subsequentes. Outro aspecto importante é o local em que o animal foi encontrado, o qual pode inferir na viabilidade celular, uma vez que pela presença de micro-organismos ou insetos, o tecido coletado pode vir apresentar contaminações posteriores.

Cultivo primário, subcultivos e estabelecimento de linhagens celulares a partir de biópsias da pele

O cultivo celular se desenvolveu a partir dos últimos anos do século XIX como uma continuação das técnicas de embriologia. O zoólogo americano R. Harrison (1907) é considerado o iniciador dos cultivos teciduais de animais, realizando cultivos de medula espinhal embrionária de anfíbios. Em geral, a formação de uma linhagem celular a partir de um cultivo primário implica em um acréscimo no número total de células por várias passagens e a predominância de células com alta capacidade de crescimento, resultando em um alto grau de uniformidade na população final. Normalmente, a escolha do substrato é um pré-requisito para a proliferação celular (Freshney, 2000).

Rotineiramente, após o processamento das amostras teciduais em fragmentos menores, estes são distribuídos em média de quatro fragmentos por placa de poliestireno tratadas para aderência celular. Antes da inserção desses fragmentos nas placas, as mesmas são umedecidas com meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 0,22 mM de piruvato de sódio, 26,2 mM de bicarbonato de sódio, 100 UI/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino. Todas as placas são incubadas a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ (Keefer et al., 2002; Hayes et al., 2005; Pereira et al., 2013).

Os cultivos primários são monitorados a cada 24 h para acompanhamento do crescimento celular e substituição total de meio de cultivo. Uma vez que se iniciar o crescimento celular ao redor dos fragmentos, o meio de cultivo é trocado a cada 48 h. Quando 70% de confluência celular forem adquiridas nas placas, os cultivos são subcultivados. Em geral, os explantes são cultivados nessas condições durante 7-14 dias. Adicionalmente, para confirmar as características morfológicas das células derivadas da pele as mesmas podem ser caracterizadas quanto à presença de vimentina (Cetinkaya & Arat, 2011).

Após duas semanas, os fibroblastos podem ser tripsinizados e semeados em uma nova placa, resultando na passagem 1 (Pereira et al., 2013). As passagens são realizadas através da tripsinização, pela adição de tripsina que resulta no rompimento das junções entre as células e as mesmas se desagregam do fundo da placa. Brevemente, o meio de cultivo das placas é descartado, as placas são lavadas com PBS e em seguida solução de tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02% é adicionada e incubada a 38,5°C por até 15 min. Com as células em suspensão, é adicionado meio de cultivo para inibição da enzima e, após a ressuspensão, uma alíquota das células é corada com azul de trypan, que cora em azul as células mortas, e estas células são contabilizadas em câmara de Neubauer. As células são centrifugadas e após o estabelecimento do número de células/mL, é realizada a primeira passagem, utilizando uma concentração final de $2,0 \times 10^5$ células/mL. A segunda passagem é realizada quando as células atingem 70% de confluência e estas são criopreservadas para posterior utilização ou imediatamente utilizadas.

Finalmente, quando é necessário produzir linhagens celulares transfectadas, amostras a partir de subcultivos são submetidas a processos de inserção de gene exógeno no genoma que se pretende modificar (Cibelli et al., 1998). Em geral, diferentes métodos de transfecção celular podem ser utilizados, como eletroporação e moléculas lipídicas ou lipossomas (Oliveira et al., 2005; Vichera et al., 2011). Contudo, uma limitação potencial do uso de fibroblastos adultos transfectados como doadores de núcleo consiste no período de cultivo prolongado necessário para a programação, transfecção, seleção e expansão da linhagem celular. Cada uma destas etapas requer passagens repetidas, bem como períodos de cultivos longos que podem induzir perturbações nas células doadoras, resultando numa redução na eficiência da TNCS (Forsberg et al., 2001).

Criopreservação de células derivadas da pele para a clonagem

A criopreservação define-se como uma técnica de conservação de material genético, podendo variar desde o seu método a quantidades e tipos de crioprotetores e variações de temperaturas. Em geral, o tipo de material a ser criopreservado (células vs. tecidos) promoverá as modificações de protocolos e outras variações existentes. Assim, a criopreservação pode ser classificada em congelamento lento, congelamento rápido e vitrificação. Todas essas técnicas são diferenciadas essencialmente pelas variações de temperatura e quantidade dos crioprotetores utilizados.

No que se refere à conservação de células, estas quando criopreservadas podem apresentar uma alta viabilidade, permitindo um armazenamento contínuo e disponibilidade para a formação de criobancos (Léon-Quinto et al., 2011). Associado a criopreservação celular, o uso da reconstrução embrionária interespecífica tem permitido conservar e recuperar animais em vias de extinção (Song et al., 2007; Folch et al., 2009).

A criopreservação tem permitido a preservação de células somáticas derivadas da pele por tempo prolongado, mantendo suas propriedades biológicas depois do aquecimento. O aprimoramento de protocolos eficientes de congelamento e aquecimento permitiram a preservação de células somáticas até -196°C, usualmente com mínimo efeito sobre a estrutura e funcionalidade celular. Embora vários trabalhos já tenham mostrado a eficiência destes protocolos na conservação celular (Song et al., 2007; Pereira et al., 2013), é sabido que os métodos de congelamento podem influenciar a atividade metabólica e função celular (Harding et al., 2006).

Rotineiramente, as células da segunda passagem são ressuspensas por tripsinização e, em seguida, realizada contagem celular em câmara de Neubauer. Para a congelamento lento, é utilizada uma concentração final de 2×10^6 células/mL em meio de cultivo acrescido de 10% de crioprotetor. A suspensão celular é armazenada em suporte de congelamento adequado identificado por linhagem celular, passagem, concentração de células/mL e data da congelamento. Os suportes de congelamento são colocados em uma rampa de congelamento na seguinte ordem: 10 min a 4°C e 10 min em vapor de nitrogênio. Finalmente, todas as amostras são armazenadas em botijão de nitrogênio.

Para o aquecimento, amostras celulares são aquecidas em banho-maria a 37°C por até 5 min. Em seguida, o conteúdo celular é centrifugado para a retirada do crioprotetor. O *pellet* é contado e as células distribuídas em novas placas de cultivo.

Preparação das células doadoras antes da transferência nuclear

Vários estudos têm sido desenvolvidos quanto à necessidade de sincronização/parada do ciclo celular na fase G0/G1 (Akshey et al., 2011, Choresca et al., 2009). Em geral, a parada do ciclo em G0/G1 pode ser alcançada pela privação de soro fetal bovino, inibição por contato ou inibidores meióticos.

Rotineiramente, após atingir a confluência nos subcultivos, as células podem ser ressemeadas em outras placas, sendo as células utilizadas para TNCS após três ou quatro passagens. Estas células

são mantidas em confluência ou cultivadas em meio suplementado com 0,5% de soro, a fim de aumentar a proporção de células em G0/G1 (Chesné, 2006). As células são preparadas por tripsinização 30 min antes da transferência nuclear, sendo as mesmas lavadas em meio fluido do oviduto sintético (SOF) tamponado com HEPES (Lagutina et al., 2007).

Pereira et al. (2013), produzindo embriões transgênicos para o hG-CSF por *handmade cloning*, também verificaram o perfil de crescimento de células derivadas da pele de um caprino transgênico antes da reconstrução embrionária e sincronizadas pelo método de inibição por contato selecionando a partir da alta confluência celular. Para tanto, análises padrões do fenótipo celular e atividade proliferativa pelo cálculo do tempo de duplicação celular (em inglês, *population duplication time*, PDT) foram realizadas como análises prévias, demonstrando que células da pele de um caprino transgênico apresentavam potencial de desenvolvimento na geração de clones blastocistos, possuindo cinética de crescimento de 23 h.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A transferência nuclear de células somáticas consiste numa biotécnica multifatorial, dependendo do sucesso de todas as suas etapas para a produção de embriões e crias clones. Em especial, a preparação de células doadoras de núcleo representa a etapa inicial e importante na eficiência final da técnica. Nesse contexto, a busca por protocolos simples e padronizados entre laboratórios, bem como o uso de células de fácil manipulação e em grandes quantidades representam os requisitos-chaves na escolha do tipo celular a ser recuperado. Fibroblastos isolados da pele de fetos ou animais adultos ainda é o modelo mais utilizado para a reconstrução embrionária. Finalmente, associado com a clonagem, células criopreservadas também favorecem a conservação do material genético pela formação de bancos de germoplasma de diferentes espécies. Finalmente, pesquisas ainda necessitam ser realizadas objetivando compreender os eventos relacionados com a produção de células pluripotencialmente induzidas a partir de células somáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akshey, Y.S.; Malakar, D.; De, A.K. et al. Effect of roscovitine treated donor cells and different activation methods on development of handmade cloned goat (*Capra hircus*) embryos. *Theriogenology*, v. 75, p. 1516-1524, 2011.

Baguisi, A.; Behboodi, E.; Melican, D.T. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 456-461, 1999.

Baldassarre, H.; Hockey, D.K.; Olaniyan, B. et al. Milk composition studies in transgenic goats expressing recombinant human butyrylcholinesterase in the mammary gland. *Transgenic Research*, v. 17, p. 863-872, 2008.

Bertolini, L.R.; Feltrin, C.; Gaudencio-Neto, S. et al. Clonagem animal: a sobrevivência dos mais aptos. *Ciência Animal*, v. 22, p. 82-105, 2012.

Briggs, R.; King, T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 38, p. 455-461, 1952.

Campbell, K.H.; Mcwhir, J.; Ritchie, W.A. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v. 380, p. 64-66, 1996.

Centinkaya, G.; Arat, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. *Cryobiology*, v. 63, p. 292-297, 2011.

Chen, D.Y.; Jiang, M.X.; Zhao, Z.J. et al. Cloning of Asian Yellow Goat (*C. hircus*) by somatic cell nuclear transfer: telophase enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 28-34, 2007.

Chesné, P. Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: Freitas, V.J.F. (Ed). *Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, p.21-29, 2006.

Choresca Jr., C.H.; Koo, O.J.; Oh, H.J. et al. Different culture conditions used for arresting the G0/G1 phase of the cell cycle in goldfish (*Carassius auratus*) caudal fin-derived fibroblasts. *Cell Biology International*, v. 33, p. 65-70, 2009.

Cibelli, J.B.; Stice, S.L.; Golueke, P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

Dutta, R.; Malakar, D.; Khate, K. et al. A comparative study on efficiency of adult fibroblast, putative embryonic stem cell and lymphocyte as donor cells for production of handmade cloned embryos in goat and characterization of putative ntES cells obtained from these embryos. *Theriogenology*, v. 76, p. 851-863, 2011.

Folch, J.; Cocero, M.J.; Chesné, P. et al. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v. 71, p. 1026-1034, 2009.

Forsberg, E.J.; Strelchenko, N.S.; Augenstein, M.L. et al. Production of cloned cattle from *in vitro* systems. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 327-333, 2001.

Freitas, V.J.F.; Melo, L.M.; Pereira, A.F. et al. Transgênese e Clonagem em pequenos ruminantes. In: Oliveira, M.E.F.; Vicente, W.R.R.; Teixeira, P.P.M. *Biotécnicas Reprodutivas em ovinos e caprinos*. 1ed. São Paulo: MedVet Livros, v. 1, p. 150-170, 2013.

Freshney, R.I. Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique. 4 ed. New York: Wiley-Liss, 2000.

Galli, C.; Duchi, R.; Moor, R.M. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*, v. 1, p. 161-170, 1999.

Gambini, A.; Jarazo, J.; Olivera, R. et al. Equine: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. *Biology of Reproduction*, v. 87, p. 1-9, 2012.

Gerger, R.P.C.; Ribeiro, E.S.; Forell, F. et al. *In vitro* development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. *Genetic and Molecular Research*, v. 9, p. 295-302, 2010.

- Harding, K.; Benson, E.E.; Muller, J. et al. Cryopreservation of storage recalcitrant algae through fundamental studies of thermal behaviour and oxidative stress. *Cryobiology*, v. 53, p. 399-400, 2006.
- Hayes, O.; Rodriguez, L.L.; González, A. et al. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and *in vitro* development into blastocysts of bovine cells lines used in somatic cell cloning. *Zygote*, v. 13, p. 277-282, 2005.
- Kato, Y.; Tani, T.; Sotomaru, Y. et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v. 282, p. 2095-2098, 1998.
- Keefer, C.L.; Baldassarre, H.; Keyston, R. et al. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 849-856, 2001.
- Keefer, C.L.; Keyston, R.; Lazaris, A. et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 199-203, 2002.
- Kubota, C.; Yamakuchi, H.; Todoroki, J. et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, p. 990-995, 2000.
- Lagutina, I.; Lazzari, G.; Duchi, R. et al. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*, v. 67, p. 90-98, 2007.
- Lan, G.C.; Chang, Z.L.; Luo, M.J. et al. Production of cloned goats by nuclear transfer of *cumulus* cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, p. 834-840, 2006.
- León-Quinto, T.; Simón, M.A.; Cadenas, R. et al. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, v. 68, p. 227-233, 2014.
- León-Quinto, T.; Simón, M.A.; Sanchez, A. et al. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. *Cryobiology*, v. 62, p. 145-151, 2011.
- Oback, B.; Wells, D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning and Stem Cells*, v. 2, p. 147-168, 2002.
- Oliveira, R.R.; Carvalho, D.M.; Lisauskas, S. et al. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. *Genetic and Molecular Research*, v. 4, p. 185-196, 2005.
- Pereira, A.F.; Feltrin, C.; Almeida, K.C. 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*, v. 109, p. 163-72, 2013.
- Pereira, A.F.; Freitas, V.J.F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, p. 118-128, 2009.
- Pereira, A.F.; Melo, L.M.; Freitas, V.J.F.; Salamone, D.F. Phosphorylated H2AX in parthenogenetically activated, *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos. *Zygote*, *in press*, 2014.
- Polejaeva, I.A.; Chen, S.H.; Vaught, T.D. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v. 404, p. 86-90, 2000.
- Ribeiro, E.S.; Gerger, R.P.; Ohlweiler, L.U. et al. 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.
- Salamone, D.; Baraño, L.; Santos, C. et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotechnology*, v. 124, p. 469-472, 2006.
- Shiga, T.; Oppenheim, R.W. Close spatial-temporal relationship between islet-1-expressing cells and growing primary afferent axons in the dorsal spinal cord of chick embryo. *Journal of Comparative Neurology*, v. 405, p. 388-393, 1999.
- Silvestre, M.A.; Saeed, A.M.; Cervera, R.P. et al. Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. *Theriogenology*, v. 59, p. 1469-1477, 2003.
- Silvestre, M.A.; Sánchez, J.P.; Gómez, E.A. Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Theriogenology*, v. 49, p. 221-229, 2004.
- Song, J.S.; Hua, S.; Zhang, Y. Culture, characteristics and chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. *In Vitro Cell Development and Biology*, v. 43, p. 203-209, 2007.
- Speemann, H. *Embryonic development and induction*. New York: Hafner, p.210-211, 1938.
- Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, p. 663-676, 2006.
- Vichera, G.; Moro, L.; Salamone, D.F. Efficient transgene expression in IVF and parthenogenetic bovine embryos by intracytoplasmic injection of DNA-liposome complexes. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p. 214-220, 2011.
- Wakayama, T.; Perry, A.C.F.; Zuccotti, M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with *cumulus* cell nuclei. *Nature*, v. 394, p. 369-374, 1998.
- Wang, L.; Peng, T.; Zhub, H. et al. *In vitro* development of reconstructed ibex (*Capra ibex*) embryos by nuclear transfer using goat (*Capra hircus*) oocytes. *Theriogenology*, v. 73, p. 135-141, 2007.
- Wilmut, I.; Schnieke, A.E.; Mcwhir, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v. 385, p. 810-813, 1997.