

# Clonagem em ruminantes: anomalias placentárias e disfunções perinatais

**Carina de Fátima Guimarães**  
**Marcela Gonçalves Meirelles**  
**Bruna Marcele Martins de Oliveira**  
**Fabio Celidonio Pogliani**  
**Claudia Barbosa Fernandes**

## RESUMO

A clonagem animal traduz um grande avanço na biotecnologia animal e um interesse cada vez maior em produzir animais de padrões genéticos superiores, ou manter características desejáveis nos rebanhos. Tal técnica tem resultado em insucesso nas taxas de recuperação de neonatos viáveis e adultos sistemicamente normais. Esta ineficiência está relacionada em grande parte a uma reprogramação nuclear falha, alterações placentárias e disfunções perinatais. A literatura atualmente compulsada relata o atraso no desenvolvimento do trofoblasto, número reduzido de placentônio, desenvolvimento vascular comprometido, que resultam em deficiências nas trocas materno-fetais, menores expressões de importantes fatores, como VEGF e bFGF menores concentrações de progesterona provenientes da placenta; anormalidades dos envoltórios fetais, aumento das dimensões do cordão umbilical, alterações imunológicas e expressão inadequada de genes apoptóticos, levando a problemas de retenção placentária. Em gestações mais avançadas, hidroalantoide e síndrome do feto gigante são observadas em aproximadamente 50 % dos nascimentos, associadas ou não às disfunções cardiorrespiratórias, imunológicas, hepáticas, renais e articulares ou alterações multissistêmicas, culminando em perdas gestacionais ou perinatais em 90% dos animais produzidos por técnica de clonagem. Avanços na aplicabilidade da técnica de clonagem por Transferência Nuclear são buscados incessantemente a fim de minimizar as deficiências geradas e presentes no procedimento utilizado.

**Palavras-chave:** Clone. Bovinos. Neonato. Placenta. Transferência nuclear.

## Ruminant cloning: Placental abnormalities and perinatal disorders

### ABSTRACT

The animal cloning represents a great advance in animal biotechnology and a growing interest in producing animals of superior genetic patterns, or maintain desirable characteristics in livestock. Animal cloning has resulted in failure recovery rates of viable neonates and systemically normal

---

**Carina de Fátima Guimarães e Marcela Gonçalves Meirelles** – Mestrandas do Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – USP – São Paulo – São Paulo, Brasil, 2012. E-mail: carina-guimaraes@ig.com.br

**Bruna Marcele Martins de Oliveira** – Doutoranda do Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – USP – São Paulo – São Paulo, Brasil, 2012. Email: brumoliveira@hotmail.com

**Fabio Celidonio Pogliani** – Prof. Dr. Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – USP – São Paulo – São Paulo, Brasil, 2010. E-mail: pogliani@yahoo.com

**Claudia Barbosa Fernandes** – Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – USP – São Paulo – São Paulo, Brasil, 2008. Email: fernandescb@usp.br

Veterinária em Foco	Canoas	v.9	n.2	p.100-109	jan./jun. 2012
---------------------	--------	-----	-----	-----------	----------------

adults. This inefficiency is mainly related to nuclear reprogramming failure, placental and perinatal disorders. The reviewed literature reports the delay in the development of the trophoblast, reduced number of placentomes, impaired vascular development that results in deficiencies in the maternal-fetal exchanges, lower expression of VEGF and bFGF factors, low levels of progesterone from the placenta, fetal envoltory abnormalities, increased size of the umbilical cord, immunological changes and inadequate expression of genes leading to apoptotic placental retention problems. In advanced pregnancies, hydrallantois and large calf syndrome are observed in approximately 50% of births, being or not associated with cardio-respiratory, immune, liver and kidney disorders or multisystemic changes, culminating in gestational losses or perinatal abortion in 90% of animals produced by cloning technique. Advances in the applicability of the technique for cloning by nuclear transfer are continuously sought in order to minimize the defects generated and the present procedure.

**Keywords:** Clone. Bovine. Neonate. Placenta. Nuclear transfer.

## INTRODUÇÃO

A clonagem animal traduz um grande avanço na biotecnologia animal e um interesse cada vez maior em produzir animais de padrões genéticos superiores, ou manter características desejáveis nos rebanhos (ARNOLD et al., 2002).

Embora muitas espécies tenham sido clonadas com sucesso, sugerindo boas perspectivas, o processo ainda não é considerado eficiente, decorrente a baixas taxas de gestação e altas perdas gestacionais (PANARACE et al., 2007; KOHAN-GHADR et al., 2008), sendo observado que apenas 6 a 8% dos fetos apresentam-se viáveis ao nascimento (MIGLINO, 2004).

Atualmente sabe-se que grande parte das perdas no período gestacional de clones bovinos e ovinos está relacionada à deficiência do desenvolvimento vascular placentário e, conseqüentemente, à deficiência na funcionalidade da placenta (ARNOLD et al., 2002; BAUERSACHS et al., 2009). No entanto, os problemas com animais clonados não se restringem somente às disfunções placentárias como também a disfunções respiratórias, cardiocirculatórias, imunológicas, hepáticas, renais, articulares e até mesmo disfunções multissistêmicas. O peso elevado dos bezerros no nascimento também é um problema frequentemente detectado (BATCHELDER et al., 2007; CHAVATE-PALMER, et al., 2007). No entanto, o exato mecanismo envolvido no alto número de anomalias placentárias e neonatais ainda permanece como objetivo de pesquisas e será revisado neste trabalho.

## CLONAGEM ANIMAL POR MEIO DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

A Transferência Nuclear (TN) foi inicialmente proposta por Spemann, em 1938, como instrumento para o estudo da equivalência nuclear, entretanto, apenas em 1952 os pesquisadores Briggs e King conseguiram realizar a técnica em anfíbios. A hipótese de que células completamente diferenciadas poderiam ser usadas para a clonagem de animais somente foi confirmada 50 anos mais tarde, com o nascimento da ovelha Dolly, produto

de um núcleo originário de uma célula de tecido mamário, retirado de um animal adulto (BORDIGNON et al., 2008).

Os procedimentos normalmente utilizados para produção de embriões por meio de TN se baseiam nos descritos por Willadsen e colaboradores (1995) e envolvem a obtenção e cultivo das células doadoras de núcleo, obtenção e maturação *in vitro* (MIV) de citoplastos receptores, enucleação, reconstrução e fusão com o núcleo doador, ativação e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões gerados, seguidos de transferência para as receptoras (PEREIRA; FREITAS, 2009; YAMAZAKI, 2006).

A obtenção e preparação das células doadoras de núcleo variam em função do tipo de célula utilizada. Atualmente, têm-se utilizado embriões, fetos, neonatos, animais jovens, e até mesmo animais que tenham vindo a óbito (YAMAZAKI, 2006). A possibilidade da utilização de animais adultos de qualidade comprovada revela uma grande vantagem da utilização da técnica (MIGLINO, 2004). Na rotina verificam-se praticidade e eficiência de linhagens celulares primárias, estáveis, homogêneas e estabelecidas a partir de fibroblastos coletados da pele, principalmente devido à alta capacidade mitótica e da resistência ao processo de criopreservação (HEYMAN et al., 2002).

A sincronização do ciclo celular entre o núcleo doador e citoplasto receptor é importante para assegurar o correto desenvolvimento após a reconstrução. A sincronização do ciclo celular pode ser efetuada com fármacos responsáveis pela inibição da replicação do DNA, ou de forma a interromper o ciclo celular na metáfase ou ainda na ativação do Fator Promotor de Maturação – MPF (YAMAZAKI, 2006). No entanto, para que ocorra manutenção da ploidia normal dos blastômeros, eles devem estar nas fases G0-G1 no momento da TN (FERNANDES, 2008).

Na obtenção de citoplastos receptores, têm-se utilizado ovócitos em estágio de metáfase II (M-II) (FERNANDES, 2008; YAMAZAKI, 2006); maturados *in vitro*, em condições de cultivo que favoreçam a qualidade e competência ovocitárias (DIELEMAN et al., 2002). É durante a ovogênese que os ovócitos em desenvolvimento acumulam proteínas, RNAm e seus percussores, no interior do citoplasma, necessários para o início do desenvolvimento embrionário. Este período é o que antecede a ativação do genoma embrionário que ocorre nos bovinos no estágio de 8 a 16 células. Sendo assim, o desenvolvimento embrionário depende dos três primeiros dias de desenvolvimento dos transcritos maternos, portanto, o sucesso da TN depende da qualidade do citoplasto receptor (FERNANDES, 2008).

Após o período de maturação *in vitro*, realiza-se a enucleação dos ovócitos por micromanipulação, que consiste na aspiração de uma porção do citoplasma onde se localiza a cromatina ovocitária (YAMAZAKI, 2006).

Na reconstituição dos zigotos, o método mais utilizado para transferir um núcleo doador para um citoplasto receptor, é pela fusão entre as membranas plasmáticas das células (BORDIGNON et al., 2008).

A eletrofusão é utilizada na maioria das espécies, e compreende um pulso de corrente alternada com o intuito de alinhar as membranas a serem fundidas em posição paralela aos eletrodos e outra direta para induzir a formação de poros nas membranas, o que leva à fusão entre as células (BORDIGNON et al., 2008).

Outra técnica também utilizada é a injeção nuclear intracitoplasmática, realizada com a introdução da célula ou do núcleo isolado no citoplasto receptor, técnica semelhante à injeção intracitoplasmática de gametas. O isolamento do núcleo, bem como a injeção intracitoplasmática, podem ser realizadas por meio do método piezo elétrico (FERNANDES, 2008; YAMAZAKI, 2006).

A ativação da célula recém-reconstituída é a penúltima etapa decisiva para o sucesso da TN (BORDIGNON et al., 2008). Durante o processo de fertilização ovocitária ocorre um rearranjo das organelas citoplasmáticas, alterações nas concentrações de cálcio intracelular, recrutamento de mRNAs, formação de pró-núcleo e síntese de DNA (FISSORE et al., 1999). Na clonagem, os atuais protocolos de ativação estão geralmente fundamentados na indução da ativação paternogenética de ovócitos em metáfase II e nos dados do subsequente desenvolvimento embrionário (FISSORE et al., 1999). Assim como no espermatozoide, os métodos artificiais utilizados para ativação dos ovócitos também se baseiam na indução de oscilações de cálcio intracitoplasmática (BORDIGNON et al., 2008). Ativações ineficientes ou não fisiológicas podem levar a falhas do desenvolvimento embrionário mesmo após a implantação (BORDIGNON et al., 2008; YAMAZAKI, 2006).

Após a reconstituição embrionária e ativação, têm-se adotado basicamente as mesmas condições de cultivo de embriões produzidos *in vitro* (PIV). O método de cultivo *in vitro*, bem como o estágio de desenvolvimento no qual os embriões reconstituídos são transferidos para receptoras, varia de acordo com a espécie (YAMAZAKI, 2006). A porcentagem de embriões reconstruídos que atinge o estágio de blastocisto, em geral, é inferior a dos embriões PIV (WESTHUSIN et al., 2001).

A reprogramação completa do núcleo de uma célula somática com o citoplasto receptor deveria resultar um embrião com padrão de transcrição gênica similar àqueles produzidos *in vivo* (RIDEOUT et al., 2001). Essa reprogramação resume-se na totipotência celular com função equivalente ao zigoto (PALMIERI et al., 2008). A micromanipulação e o cultivo de embriões bovinos está relacionada a anormalidades; no entanto, acredita-se que a mortalidade gestacional e pós-natal possa ser decorrente de uma reprogramação nuclear incompleta, o que leva a expressão errônea de genes, portanto, ao não desenvolvimento embrionário (PALMIERI et al., 2008), o que resultará em prejuízo da formação de proteínas envolvidas no desenvolvimento placentário, sistema imune e esteroidogênese fetal (WAKISAKA-SAITO et al., 2006; SANTOS et al., 2010). Santos e colaboradores (2010) ainda afirmam que alterações epigenéticas têm estreita correlação com o tipo de célula doadora, com a metilação de histonas e com os mecanismos ligados ao DNA.

## **ANOMALIAS PLACENTÁRIAS NA GESTAÇÃO DE CLONES RUMINANTES**

As perdas ao longo da gestação são características do desenvolvimento fetal de clones, sendo esse um dos maiores obstáculos a ser vencido durante o desenvolvimento desta técnica (CHAVATE-PALMER et al., 2007).

As alterações placentárias estão entre as principais causas apontadas como responsáveis pelas perdas gestacionais de clones bovinos e ovinos e estão relacionadas à deficiência do desenvolvimento vascular placentário, demora na implantação, formação de número reduzido de placentônios, placentomegalia e conseqüentemente deficiência na funcionalidade da placenta (ARNOLD et al., 2008; BORDIGNON et al., 2008; BAUERSACHS et al., 2009; KOHAN-GHADR et al., 2008). As falhas no desenvolvimento placentário são responsáveis pela morte de aproximadamente, 82% dos bovinos clonados entre o 30º e 90º dia de gestação e, dentre os neonatos, apenas uma pequena proporção possui fenótipo, crescimento e sistema imune funcionais normais (MIGLINO, 2004).

Perdas iniciais são atribuídas à inadequada transição da nutrição do saco vitelínico para o alantoide em decorrência da falta ou ineficiência de vascularização, à rejeição imune e alterações de placentônios (HILL et al., 2000).

O baixo desenvolvimento da placenta caracterizado pela presença de poucos placentônios, cerca de 60% menores em número e de 50% maiores em tamanho e pela baixa vascularização tem sido frequentemente descrito na fase inicial das gestações. Os locais de trocas materno-fetais podem ainda apresentar-se edemaciados com focos hemorrágicos, correlacionando-se diretamente com o comprometimento vascular (MIGLINO, 2004).

Perdas que costumam ocorrer na segunda metade da gestação são descritas em decorrência de hidroalantoide (CONSTANT et al., 2006) enquanto que alterações como aumento na espessura do cordão umbilical e membranas placentárias edematosas são descritas nos diferentes estágios da gestação (POGLIANI, 2010).

Miglino (2004) e Bordignon (2008) sugeriram a existência de três tipos de alterações na placenta de animais clonados produzidos por TN: o subdesenvolvimento do epitélio coriônico da placenta, com evidente decréscimo dos vasos sanguíneos do alantoide, promovendo a morte fetal antes mesmo da formação dos placentônios; a diminuição do número de cotilédones, sem desestruturação do epitélio coriônico, gerando uma diminuição nas trocas materno-fetal, culminando em morte do feto próximo aos 60 dias de gestação e, por fim, diminuição do número dos cotilédones associado ao aumento do tamanho destes e edema dos envoltórios fetais no terço final da gestação. A redução numérica dos placentônios e a observação do aumento do diâmetro dos cotilédones indicam a deficiência no desenvolvimento placentário ou uma ligação materno-fetal inadequada. Dessa forma pode-se inferir que o aparecimento de cotilédones gigantes seria um mecanismo compensatório para a placentação deficiente no início da gestação (MIGLINO, 2004).

Alterações morfológicas nas placentas de clones bovinos sugerem uma falta de arquitetura para suportar o crescimento fetal, e dentre os principais achados encontram-se o sistema capilar materno com menor número de ramificações e com menor diâmetro, os vilos mais curtos quando deixam o eixo materno, a árvore vilosa com arranjo desorganizado e células trofoblásticas com núcleos alterados (LACERDA, 2006).

Palmieri e colaboradores (2008) avaliaram o peso das carúnculas de placentas de fetos ovinos provenientes de inseminação artificial (IA), PIV e TN aos 150 dias de gestação e comprovaram que as carúnculas de gestações TN apresentavam peso aumentado ( $1133 \pm 86$ g) seguido das carúnculas PIV ( $811 \pm 109$ g) e IA ( $802 \pm 28$ g). É possível que o aumento da massa e área de superfície dos placentônios seja uma estratégia do organismo animal para tentar compensar a redução do número destas estruturas e da deficiência circulatória envolvida no processo (BORDIGNON et al., 2008).

Miglino (2004) comparou a produção de progesterona (P4) na placenta de bovinos clonados e não clonados, sob a influência do fator de crescimento endotelial (VEGF) e do fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF). Foi verificado que as células placentárias das gestações dos animais clonados não são capazes de produzir P4, tal como as células placentárias de gestações controle na mesma fase. Na comparação das reações imunomarcadas dos placentônios o VEGF e o bFGF estão menos expressos nas amostras dos animais clonados, indicando que dois dos principais fatores controladores da vasculogênese e angiogênese na placenta de clones estão alterados.

Yamazaki (2006) avaliou os padrões de expressão dos genes imprinted IGF2, de expressão paterna, e H19 e IGF2r, de expressão materna, na placenta de clones bovinos. Alterações no padrão de expressão dos genes imprinted H19 e IGF2 podem provocar distúrbios na placenta e no desenvolvimento do feto, o que pode contribuir para a mortalidade pós-natal. A placenta dos clones apresentou diminuição da expressão relativa dos genes H19 (41,5%) e IGF2 (42,9%) em comparação ao grupo controle. As placentas de clones fêmeas apresentaram diminuição de 72,6% dos transcritos de H19 quando comparados com a placenta de clones machos. Na placenta de clones pesando mais que 40kg, foi observada diminuição da expressão relativa do H19 (40,1%) e IGF2 (36,3%), em comparação ao grupo controle. A diminuição da regulação do gene H19 na placenta de clones fêmea sugere que o processo de reprogramação em alguns genes pode ser influenciado pelo sexo (YAMAZAKI, 2006).

Palmieri e colaboradores (2008) supõem que a disfunção na placentação em gestações por TN resulta das aberrações na expressão de alguns genes conhecidos por serem necessários para a proliferação e diferenciação, Mash2 e Hand1, respectivamente, dos trofoblastos. Desta forma, compararam a expressão desses genes em trofoblastos de embriões provenientes de monta natural, PIV e TN anterior ao dia 17º e posterior ao 40º dia de gestação e foi possível observar que houve maior expressão dos genes nos cotilédones de TN. As alterações desses genes na TN podem causar diferenciação anormal dos trofoblastos e contribuírem para as perdas gestacionais (ARNOLD et al., 2002).

A retenção de placenta é frequente após o parto de clones, sugerindo menor frequência de apoptose nos placentônios provenientes de TN. Quantificando-se a

expressão dos genes apoptóticos BAX, BCL2 e GAPDH em placentônios provenientes de TN, foi verificado que o gene BAX possui uma redução de expressão no grupo de TN, corroborando com a hipótese inicial de que a falha na apoptose pode ser responsável pela redução na taxa de regressão dos placentônios aumentando, portanto, os casos de retenção placentária (BRAGA, 2006).

Em bovinos clonados, ocorre expressão anormal do complexo de histocompatibilidade maior do tipo I no trofoblasto e um maior acúmulo de linfócitos T no endométrio, o que sugere que a rejeição imunológica também possa estar contribuindo para a grande incidência de perdas gestacionais de embriões clonados (HILL et al., 2000).

## **DISFUNÇÕES PRÉ E PÓS-NATAIS EM CLONES RUMINANTES**

A taxa de neonatos viáveis ainda é baixa, com média entre 6-8%, podendo variar entre 0% e 12% (KEEFER, 2008; MIGLINO, 2004; OBACK, 2008; PANARACE et al., 2007). São descritas alterações associadas à clonagem e complicações peri e pós-natais tais como: má formação congênita em órgãos, como coração e rins, macrossomia ou síndrome do neonato gigante, disfunções respiratórias, cardiocirculatórias, imunológicas, hematológicas, bioquímicas, hormonais, hepáticas, umbilicais, metabólicas e musculoesqueléticas (BORDIGNON et al., 2008; MAIORKA et al., 2005; MEIRELLES et al., 2010; WILSON et al., 1995; SANTOS et al., 2010; BRISVILLE et al., 2011). As condições descritas pelo termo “síndrome do neonato gigante” ou conhecidas como “síndrome da placenta grande” estão presentes em um total de 50% das gestações provenientes de TN (LANDIM-ALVARENGA, 2006). O aumento na concentração da glicoproteína plasmática materna PSP60, produzida pelas células trofoblásticas binucleadas, pode estar correlacionada com o crescimento compensatório do feto a partir do 70º dia de gestação (HEYMAN et al., 2002; LANDIM-ALVARENGA, 2006; MIGLINO, 2004). Estas e outras alterações como edema nas membranas da placenta, placentomegalia, aumento do peso ao nascimento, hepatomegalia, acúmulo de gordura nos hepatócitos, congestão hepática foram descritas em fetos ovinos (PALMIERI et al., 2008), assim como aumento da vascularização na região do cordão umbilical em fetos bovinos (BORDIGNON et al., 2008).

Em um estudo de Kohan-Ghadr e colaboradores (2008) 40% das gestações de clones atingiram o nascimento e apenas 35% dos bezerros estavam vivos ao nascer. Em ambos o comprimento do placentônio e o diâmetro umbilical estavam maiores nos clones quando comparados aos fetos controle em todo o período gestacional. As anormalidades da membrana amniótica no 120º dia de gestação, incluindo edema focal e a presença de nódulos, foram detectadas em 38% dos clones e estavam normalmente acompanhados de focos de hipercogenicidade ou irregularidades ao redor do cordão umbilical e células inflamatórias degenerativas com diminuição na espessura do epitélio coriolante.

Recentemente, Santos e colaboradores (2010) descreveram as anormalidades de clones bovinos neonatos. De 21 animais avaliados entre os dias 1 a 19 após nascimento,

30,7% apresentavam anomalias no aparelho locomotor, 46,1% alterações cardíacas 100% apresentaram padrões cianóticos, incompleta cicatrização do cordão umbilical e hidrotórax sero-fibroso. As anomalias pulmonares como enfisema pulmonar difuso, atelectasia e edema pulmonar estavam presentes em todos os animais necropsiados, sendo que 23% dos animais apresentaram congestão pulmonar. Anormalidades hepáticas foram encontradas em 46,1% dos animais, enquanto as desordens hemolinfáticas, como a hipoplasia de timo, ocorreram em 84,6% dos casos e em 100% dos animais foram encontradas linfadenomegalias. Hipoglicemia e hiperfrutosemia são achados clínicos comuns em bezerros clonados recém nascidos e o aumento da produção de frutose a partir da placenta pode ser um fator importante na etiologia das anormalidades umbilicais e cardíacas observadas nestes animais (BORDIGNON et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Limitações ainda são encontradas na produção de animais clonados por meio da técnica de TN. Estudos apontam a reprogramação nuclear como um das etapas fundamentais da biotécnica, podendo ser a gênese do problema, gerando prejuízos no desenvolvimento e implantação embrionária. As deficiências mais comumente encontradas dizem respeito a desordens placentárias de origem trofoblástica e anormalidades neonatais. Perdas em gestações iniciais são relacionadas ao número reduzido de placentônios e alterações na implantação, enquanto hidroalantoide e aumento das dimensões do cordão umbilical são achados em gestações mais avançadas. Assim, avanços na aplicabilidade da técnica de clonagem por TN são buscados incessantemente a fim de minimizar as deficiências geradas e presentes no procedimento.

## REFERÊNCIAS

- ARNOLD, D. R. et al. Placental Insufficiencies in Cloned Animals – A Workshop Report. *Placenta*, v.22, 2008.
- ARNOLD, D. R. et al. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblasto differentiation in bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v.66, p.642-650, 2002.
- BATCHELDER, C. A. et al. Perinatal physiology in cloned and normal calves: Hematologic and biochemical profiles. *Cloning and Stem Cells*, v.9, n.1, p.83-96, 2007.
- BAUERSACHS, S. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.106, n.14, p.5681-5686, 2009.
- BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Clonagem Animal por Transferência Nuclear. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO JR; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal*. 3.ed. São Paulo: Rocca, p.347-364, 2008.
- BRAGA, C. F. Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados. 83 f. Tese – Doutorado em Medicina Veterinária – Anatomia de animais domésticos e silvestres – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BRISVILLE, A. C. et al. Respiratory Diseases in Neonatal Cloned Calves. *J Vet Intern Med*. v.25 p.373-379, 2011.



CHAVATE-PALMER, P. et al. Placental expression of major histocompatibility complex class I in bovine somatic clones. *Cloning and Stem Cells*. v.9, n.3, p.346-356, 2007.

CONSTANT, F. et al. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hidrallantois. *Biology of Reproduction*, v.75, p.122-130, 2006.

DIELEMAN, S. J. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.5-20, 2002.

FERNANDES, C. B. Clonagem em equinos por meio da transferencia nuclear. 2008. 116f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

FISSORE, R. A. et al. Initiation and organization of events during the first cell cycle in mammals: applications in cloning. *Cloning*, p.89-100, 1999.

HEYMAN, P. et al. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. *Biology of Reproduction*, v.66, p.6-13, 2002.

HILL, J. R. et al. 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.

KEEFER, C. L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). *Theriogenology*, v.69, p.48-54, 2008.

KOHAN-GHADR, H. R. et al. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Theriogenology*, v.15, n.2, p. 218–230, 2008.

LACERDA, P. M. O. Aspectos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Reconhecimento materno do conceito e início da placentação. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. *Obstetrícia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.22-39.

MAIORKA, P. C. et al. Patologia de fetos e neonatos bovinos clonados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* v.57, p.113, 2005.

MEIRELLES, F. V. et al. Delivery of cloned offspring: Experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reproduction Fertility Development* v.22, n.1, p.88-97. 2010.

MIGLINO, M. A. Clonagem animal e placentação. *Acta Scientiae Veterinariae*. Supl. 32, p.75-78, 2004.

OBACK, B. Climbing mount efficiency: Small steps, not giant leaps towards higher cloning success in farm animals. *Reproduction Domestic Animal*. v.43, p.407-416, 2008.

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*, v.45, p.865-880, 2008.

PANARACE, M. et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*, v.67, p.142-151, 2007.

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Cloning in ruminants: Progress and current perspectives. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.118-128, 2009.

POGLIANI, F. C. Parâmetros ecodopplercardiográficos de bezerros da raça Nelore originados através de transferência nuclear de células somáticas adultas – Clonagem. 2010. 107p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIDEOUT, W. M.; EGGAN, K.; JAENISH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, v.293, p.1093-1098, 2001.

SANTOS, C. R. et al. Patologia de neonatos bovinos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas – clonagem. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal*, São Paulo, v.47, n.6, p.447-453, 2010.

WAKISAKA-SAITO, N. et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.349, p.106-114, 2006.

WESTHUSIN, M. E. et al. Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology*, v.55, p.35-49, 2001.

WILSON, J. M. et al. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science* v.38, n.1-2, p.73-83, 1995.

YAMAZAKI, W. Estudo do “Genomic Imprinting” na placenta de clones bovinos. 2006. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Jaboticabal.

**Recebido em:** set. 2012

**Aceito em:** nov. 2012