



Métodos alternativos de enucleação oocitária utilizados na transferência nuclear em animais

Alternative methods for oocyte enucleation used in animal nuclear transfer

N.Z. Saraiva^{1,4}, C.S. Oliveira², T.A.D. Tetzner², M.M. Souza², M.R. Lima², S.C. Méo³, J.M. Garcia²

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, FCAV, UNESP

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

³Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), São Carlos, SP, Brasil.

⁴Correspondência: naiaravet@hotmail.com

Resumo

Os fatores que influenciam o sucesso da transferência nuclear (TN) são divididos em aspectos biológicos e técnicos. O preparo de citoplastos é uma etapa técnica, porém crucial, pois essas estruturas devem ser hábeis em reprogramar o núcleo transferido e assegurar o desenvolvimento de embriões reconstituídos. Vários procedimentos de enucleação foram desenvolvidos e têm sido utilizados na TN, mas a qualidade e a quantidade de citoplasma dos oócitos receptores variam de acordo com o método usado. Abordagens alternativas de enucleação para a TN, tais como a enucleação assistida ou induzida quimicamente, além de outros novos procedimentos, como a enucleação de oócitos livres de zona pelúcida, tanto por meio de micromanipulação quanto manualmente (clonagem manual), são discutidos nesta revisão.

Palavras-chave: citoplastos, enucleação química, transferência nuclear.

Abstract

Factors influencing the success of nuclear transfer (NT) are divided into biological and technical aspects. The preparation of cytoplasts is a technical, however, crucial step, because these structures must be able to reprogram the transferred nucleus and to ensure the development of reconstructed embryos. Several enucleation procedures have been developed and used in NT, but the quality and quantity of the recipient cytoplasm vary with the method used. Enucleation alternative approaches for NT such as chemical-assisted or chemical-induced enucleation besides other new procedures as enucleation of zona-free oocytes either by micromanipulation or by hand (handmade cloning) are discussed in this review.

Keywords: cytoplasts, chemical enucleation, nuclear transfer.

Introdução

Atualmente, graças à evolução da tecnologia de transferência nuclear (TN), é possível a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos. A produção de clones é de grande interesse tanto para a comunidade científica quanto para a indústria. O crescente interesse por essa biotécnica pode ser explicado por sua gama de aplicações, dentre elas, não apenas no melhoramento genético, visando à multiplicação de indivíduos superiores, mas também na propagação de indivíduos modificados geneticamente, na preservação de espécies ameaçadas de extinção e na biomedicina, devido à possibilidade de produção de órgãos e tecidos (clonagem terapêutica).

Embora existam vários relatos de avanços na TN nos últimos anos, verifica-se ainda uma baixa eficiência desse procedimento. A baixa viabilidade dos embriões reconstituídos é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e perinatal e pelas diversas anomalias observadas nos animais recém-nascidos.

Dois componentes celulares são essenciais para a produção de um clone: o núcleo doador (carioplasto) e o oócito enucleado receptor (citoplasto), cuja constituição citoplasmática deve ser suficientemente competente para permitir a reprogramação do núcleo transferido e dar suporte ao desenvolvimento a termo. Portanto, a enucleação oocitária é um fator extremamente importante para o sucesso da clonagem de animais.

O procedimento de enucleação na TN tradicional é invasivo e envolve a coloração do núcleo e a exposição à irradiação ultravioleta, que provoca alterações de membrana e de componentes intracelulares dos oócitos (Smith, 1993). A injúria causada ao oócito receptor é agravada pela remoção de grande volume de citoplasma ao redor da placa metafásica durante o procedimento convencional de enucleação, que contém RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais desde o desenvolvimento inicial até a ativação do genoma embrionário (Barnes e Eystone, 1990).

O objetivo desta revisão é apresentar relatos recentes de procedimentos alternativos que facilitam o processo de enucleação e possibilitam a obtenção de citoplastos competentes para o processo de TN.



Histórico e aplicações da clonagem de animais

Speemann (1938) propôs inicialmente o conceito da “equivalência nuclear”, ou seja, que o núcleo de células diferenciadas teria a capacidade de iniciar e sustentar o desenvolvimento embrionário normalmente. Contudo, somente em 1952, Briggs e King demonstraram, em suas pesquisas com anfíbios (*Rana pipiens*), que o isolamento do núcleo de células embrionárias em blástula e sua introdução no interior do citoplasma de um zigoto previamente enucleado seria capaz de proporcionar o desenvolvimento embrionário normal até o estágio larval de girino.

O primeiro relato de mamíferos nascidos a partir de embriões reconstituídos foi descrito em camundongos por Illmensee e Hope (1981). A técnica envolvia o isolamento do núcleo de células da massa celular interna e sua introdução direta no citoplasma de zigotos, que eram posteriormente enucleados.

McGrath e Solter (1983) são considerados os pioneiros na reconstrução de embriões mamíferos utilizando o método denominado transferência nuclear (TN), que envolve microcirurgia e fusão celular, e não requer o isolamento e a injeção do núcleo no interior do citoplasma. Porém, o primeiro relato de um mamífero nascido a partir dessa técnica foi descrito por Willadsen et al. (1986), em ovinos.

O desenvolvimento da técnica de TN em mamíferos a partir de células embrionárias e o crescente interesse da indústria e de centros de pesquisa na multiplicação de animais geneticamente idênticos fizeram com que novos estudos fossem realizados, utilizando-se células em estágio de diferenciação mais avançado. A possibilidade de estabelecimento e manutenção de culturas de células a serem utilizadas como fonte doadora de núcleo foi fundamental para o desenvolvimento da técnica descrita por Wilmut et al. (1997), que resultou no nascimento da ovelha “Dolly”, o primeiro clone produzido a partir de células somáticas diferenciadas obtidas de um animal adulto.

Desde então, a clonagem utilizando células somáticas adultas diferenciadas já foi relatada com êxito em diversas outras espécies, como em bovinos (Kato et al., 1998), camundongos (Wakayama et al., 1998), caprinos (Baguisi et al., 1999), suínos (Polejaeva et al., 2000), gatos (Shin et al., 2002), coelhos (Chesne et al., 2002), ratos (Zhou et al., 2003), mulas (Woods et al., 2003), equinos (Galli et al., 2003), cervídeos (Burke, 2003), cães (Lee et al., 2005), ferrets (Li et al., 2006), búfalos (Shi et al., 2007) e lobos (Kim et al., 2007).

A TN é uma técnica com várias aplicações, como seleção animal, produção de animais transgênicos, conservação de espécies ameaçadas de extinção e pesquisas relacionadas à diferenciação celular e interação núcleo-citoplasmática. Além de contribuir com a ciência básica, permitindo melhor compreensão dos mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos na embriogênese, a clonagem apresenta importantes aplicações em estudos de diferenciação celular e na possibilidade de transplante de órgãos e tecidos, com as ferramentas da clonagem terapêutica e xenotransplantes (Niemann et al., 2003).

Do ponto de vista de produção animal, atualmente a clonagem está restrita a rebanhos de elite e animais com características especiais (Meirelles et al., 2007). Há necessidade de se ressaltar que a passagem do material genético dos clones para seu ciclo germinal é suficiente para corrigir eventuais falhas epigenéticas, de modo que os gametas dos clones são geneticamente e epigeneticamente semelhantes aos gametas dos indivíduos originais (Wells, 2005).

Um passo importante para a comercialização de clones foi a divulgação de um relatório elaborado pelo Food and Drug Administration – (FDA), constatando, com base em uma série de estudos, que não há risco à saúde humana associado ao consumo de produtos derivados (carne e leite) de clones bovinos (Heyman et al., 2007; Rudenko e Matheson, 2007).

Porém, as taxas de sucesso da TN, avaliadas pelo número de animais nascidos, permanecem na ordem de 1 a 5%, na maioria das espécies domésticas (Campbell et al., 2005). A baixa eficiência da clonagem e a alta mortalidade de clones podem ser causadas, em parte, pela expressão desbalanceada de alguns genes importantes para o desenvolvimento embrionário e fetal.

Os padrões de expressão gênica em embriões no período pré-implantacional são alterados pelas condições de cultivo *in vitro*, incluindo o sistema básico de cultivo, como a suplementação proteica (Wrenzycki et al., 1999, 2001a) e o protocolo de transferência nuclear (Wrenzycki et al., 2001b), sendo que modificações do protocolo de TN, como tipo de célula utilizada, número de repiques, ciclo das células doadoras de núcleo, processo de enucleação e protocolos de ativação, apresentam vários efeitos nos padrões de expressão desses genes. Assim, processos alternativos que resultem em menores injúrias provocadas aos oócitos receptores têm sido buscados ultimamente.

Produção de citoplastos receptores

A técnica de reconstituição por transferência nuclear envolve, basicamente, as seguintes etapas: obtenção das células doadoras de núcleo, obtenção de oócitos receptores, remoção da cromatina (enucleação), sincronização do ciclo celular entre célula doadora e citoplasto, introdução do núcleo doador no oócito receptor, ativação do oócito reconstituído, cultivo *in vitro* e inovulação dos embriões.

De modo geral, têm-se utilizado no processo de reconstituição oócitos maturados *in vitro* em estágio de



metáfase II. Nas espécies domésticas, principalmente em bovinos, devido à disponibilidade de ovários de abatedouro, usados nos procedimentos de fecundação *in vitro*, o emprego deste tipo de fonte doadora de citoplasma tem sido rotina na maioria dos laboratórios.

Para que o núcleo doador possa iniciar seu desenvolvimento no citoplasto, é necessária a prévia remoção do DNA dos oócitos. Este processo, denominado de “enucleação oocitária”, é essencial na TN para a manutenção da correta ploidia do embrião reconstituído. No procedimento convencional, a enucleação é realizada por microcirurgia, utilizando-se oócitos em estágio de metáfase II, com aspiração, para o interior de uma micropipeta, do primeiro corpúsculo polar e de parte adjacente do citoplasma do oócito.

Em camundongos e ratos, os cromossomos em metáfase II são visíveis em microscópio óptico como uma área translúcida (Fulka et al., 2004), porém esse não é o caso de outras espécies de mamíferos, como suínos, bovinos, ovinos e caprinos, nas quais a visualização dos cromossomos dificilmente é possível sem a coloração do DNA (Yin et al., 2002b) em decorrência da maior taxa de lipídeos. Desse modo, a maioria dos protocolos utiliza o corante específico de DNA Hoechst 33342, o qual, sob excitação à luz ultravioleta (UV), permite a visualização da cromatina e a confirmação da enucleação. Porém, sabe-se que a irradiação UV causa significativa diminuição no desenvolvimento de embriões ao estágio de blastocisto, principalmente devido à indução de alterações de membrana e de componentes intracelulares de oócitos bovinos (Smith, 1993).

Métodos alternativos de enucleação oocitária

Alguns laboratórios adotam a enucleação de oócitos em metáfase II “às cegas”, guiando-se apenas pelo 1º corpúsculo polar (CP), porém as taxas de enucleação não são muito altas devido ao deslocamento da cromatina presente no citoplasma do oócito em relação ao 1º CP no decorrer do tempo de maturação, como mostrado por Mohamed Nour et al. (1999). Esses autores observaram a cromatina em metáfase II em diferentes localizações em relação ao CP após 18 a 20 horas de maturação, encontrando 40,7% do material nuclear imediatamente adjacente ao CP, 28,8% próximo ao CP, mas não em íntima associação, 15,3% no meio do citoplasma e 15,3% do material localizado na região oposta ao CP.

A primeira tentativa de expansão das fronteiras convencionais foi a técnica descrita por Fulka e Moor (1993), a enucleação química oocitária total, utilizando-se um inibidor de síntese proteica, o etoposídeo, em oócitos em metáfase I, para auxiliar no processo de enucleação durante a extrusão do 1º CP.

Tatham et al. (1995) também desenvolveram uma técnica de enucleação oocitária, submetendo oócitos bovinos à centrifugação em um gradiente descontínuo de Percoll, para estratificação das organelas em vários graus de densidade dentro do citoplasma. Essa técnica também foi relatada por Savard et al. (2004) em suínos e por Wagoner et al. (1996) em bovinos. Nesta última espécie, os autores observaram redução na taxa de clivagem embrionária.

Outro método que tem sido considerado eficiente no preparo de citoplastos para a TN em bovinos é a enucleação em telófase (Bordignon e Smith, 1998), também descrita em ovinos (Peura et al., 2003) e camundongos (Munsie et al., 2002). A técnica consiste na ativação partenogênica de oócitos maduros e na remoção do 2º CP junto com pequena quantidade de citoplasma ao redor, por meio de micromanipulação.

Como o fluorocromo Hoechst 33342 (normalmente utilizado no procedimento convencional) possui um comprimento de onda curto (excitação 350 nm), ele acaba transferindo grande quantidade de energia ao material biológico sob excitação. Assim, Dominko et al. (2000) mostraram a possibilidade do uso de fluorocromos alternativos ao Hoechst 33342, com maior comprimento de onda, para coloração de cromatina (Sybr 14) e microtúbulos (tubulina conjugada à rodamina) em oócitos bovinos. Porém, não foram encontrados resultados adicionais sobre a viabilidade de estruturas expostas a esses fluorocromos.

Ainda, oócitos livres de zona pelúcida (“zona free”) têm sido empregados com sucesso no procedimento de TN, tanto por meio de micromanipulação (Obach et al., 2003) quanto pela técnica de clonagem manual ou “Handmade Cloning” (Vajta et al., 2001, 2003). A técnica de clonagem manual foi inicialmente baseada na bissecção ao acaso de oócitos livres de zona pelúcida, com o uso de microlâminas sob um estereomicroscópio. Em seguida, os demi-oócitos eram corados com Hoechst 33342 e expostos à irradiação UV, separando-se citoplastos de carioplastos. Essa técnica simplificada já foi relatada em suínos (Kragh et al., 2005) e bovinos (Vajta et al., 2001, 2003; Bhojwani et al., 2005; Pedersen et al., 2005) permitindo, inclusive, o nascimento de bezerros saudáveis (Tecilrioglu et al., 2003; Bartels et al., 2004).

A enucleação manual de oócitos livres de zona pelúcida também pode ser orientada pelo corpúsculo polar, mas apresenta algumas desvantagens. A separação entre o CP e o oócito que ocorre após a digestão com pronase pode ser prevenida pela pré-incubação do oócito em fito-hemaglutinina, mas é, até certo ponto, inconsistente. Ainda, um efeito desfavorável é que a fito-hemaglutinina dificulta a completa digestão da zona pelúcida pela pronase (Vajta et al., 2004). Outra possibilidade de orientação é por meio da enucleação assistida quimicamente, técnica baseada no tratamento de oócitos com agentes desorganizadores de microtúbulos, induzindo a extrusão de uma protrusão visível na superfície do oócito, que contém toda a cromatina condensada (Vajta, 2007).

Além das técnicas de enucleação descritas, outras que envolvem enucleação química têm sido adotadas



em vários procedimentos de TN.

Enucleação química

É reconhecido que a seleção de oócitos receptores de alta qualidade para a TN aumenta a eficiência da clonagem e o número de crias obtidas. Como foi dito anteriormente, o procedimento de enucleação convencional é invasivo e envolve a coloração do núcleo com Hoechst 33342 e utilização de irradiação UV para confirmação da enucleação.

Considerando-se que o oócito é enucleado durante o processo de TN, os defeitos de cromatina induzidos pela irradiação UV podem não ter papel na alteração do potencial de desenvolvimento de embriões oriundos desta técnica. Porém, o DNA mitocondrial permanece nos citoplastos enucleados podendo ser afetado durante a exposição à UV, alterando, dessa forma, o metabolismo do embrião reconstituído (Russel et al., 2005).

A injúria causada ao oócito é agravada pela remoção de volume considerável de citoplasma ao redor da placa metafásica do oócito receptor durante o procedimento de enucleação, citoplasma que contém RNAm, proteínas e precursores moleculares essenciais ao desenvolvimento embrionário inicial até a ativação do genoma embrionário. O procedimento de enucleação é também considerado um evento crucial para a clonagem devido à eliminação de qualquer contribuição genética do citoplasma receptor. Rotineiramente, a enucleação pode resultar em até 30% de DNA residual nos citoplastos (Li et al., 2004).

Assim, a enucleação química é um procedimento muito atrativo por causar mínima diminuição do volume citoplasmático e do conteúdo proteico e molecular, além de fatores associados ao fuso, que são essenciais para o adequado desenvolvimento embrionário (Russel et al., 2005). Várias substâncias têm sido utilizadas para indução de enucleação química, incluindo o etoposídeo (Fulka e Moor, 1993), a colchicina e a demecolcina (Baguisi e Overström, 2000; Gasparrini et al., 2003; Ibáñez et al., 2003).

Oócitos murinos em metáfase I, cultivados em meio suplementado com etoposídeo, um inibidor de topoisomerase II que previne a separação entre os cromossomos, seguido pelo tratamento com ciclo-heximide, um inibidor de síntese proteica, apresentaram extrusão de todo o material nuclear junto ao 1º CP, sendo que esse protocolo propiciou 96% de eficácia na enucleação, de acordo com Fulka e Moor (1993). Porém, na mesma espécie, desenvolvimento limitado foi observado com o uso de citoplastos provenientes dessa técnica (Gasparrini et al., 2003). Além de murinos e suínos (Savard et al., 2004), esse procedimento também foi descrito em bovinos, utilizando-se a demecolcina como agente químico auxiliador da enucleação, entretanto, não apresentou resultados satisfatórios na última espécie (Saraiva et al., 2009).

A enucleação assistida quimicamente de oócitos em meiose II é outra técnica que vem despertando grande interesse da comunidade científica. Normalmente, utiliza-se um agente desestruturador de microtúbulos, a demecolcina, que induz à formação de uma protrusão na região cortical oocitária, próxima ao 1º CP, contendo todo o material nuclear condensado. Acredita-se que, após a desorganização do fuso meiótico, os cromossomos fiquem condensados e, assim, se localizem próximos à membrana plasmática, ancorados em local rico em actina, fornecendo uma estrutura rígida ao córtex oocitário, o que leva à formação de uma protrusão nessa região (Kawakami et al., 2003). Desse modo, permite-se a retirada desse material por meio de micromanipulação, sem a necessidade de coloração dele.

Essa técnica já foi relatada em coelhos (Yin et al., 2002a), suínos (Yin et al., 2002b), murinos (Gasparrini et al., 2003) e bovinos (Li et al., 2004; Vajta et al., 2005; Saraiva et al., 2009), resultando em não comprometimento do desenvolvimento *in vivo* e possibilitando o nascimento de clones. Ainda, tem proporcionado taxas de enucleação entre 90 e 100% em espécies domésticas, como suínos (Kawakami et al., 2003) e bovinos (Tani et al., 2006), apresentando alta confiabilidade e eliminando a necessidade do uso de corantes específicos de DNA. Além disso, a quantidade de citoplasma retirada durante a micromanipulação é bem inferior (5 a 10%) quando comparada à técnica convencional (~30%).

Outra técnica interessante é a enucleação induzida quimicamente de oócitos pré-ativados, que visa à extrusão de todo o material nuclear juntamente com o 2º CP, e que já foi descrita em murinos (Baguisi e Overström, 2000; Gasparrini et al., 2003; Ibáñez et al., 2003), coelhos (Yin et al., 2002a), caprinos (Ibáñez et al., 2002), ovinos (Gasparrini et al., 2002) e bovinos (Russel et al., 2005). Porém, quando se compara a enucleação não invasiva de oócitos em metáfase I ou metáfase II, há uma marcante diferença. Enquanto no primeiro caso, o CP com todo o conteúdo nuclear é completamente liberado do oócito, no segundo caso o contato entre o 2º CP e o citoplasma do oócito persiste, fornecendo, dessa forma, uma enucleação somente temporária (Fulka et al., 2004) e exigindo retirada do CP por meio de micromanipulação.

Uma vantagem adicional das técnicas de enucleação química é que elas permitem a remoção dos cromossomos sem eliminar o fuso meiótico (Costa-Borges et al., 2009). De acordo com Simerly et al. (2004), a remoção do fuso meiótico durante a enucleação convencional parece ser um dos fatores responsáveis pelo baixo desenvolvimento de embriões reconstituídos com células somáticas, pelo fato de o centrôssomo e de algumas proteínas motoras, vitais para a formação do polo do fuso mitótico, serem retirados do ooplasmato, resultando em disfunções do fuso e em embriões aneuploides. Além disso, a enucleação mecânica tradicional diminui a quantidade de γ -tubulina associada ao fuso em oócitos murinos (Van Thuan et al., 2006). Diante desse cenário, métodos de enucleação química contribuem para a conservação de fatores associados ao fuso nos oócitos



enucleados, o que pode ser traduzido em maior qualidade embrionária.

Finalmente, é necessário que se pondere a ação de alguns agentes utilizados em procedimentos de enucleação química sobre as cinases dependentes de ciclinas.

Ciclo de divisão celular e controle exercido pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs)

Dentre os reguladores do ciclo celular, as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) exercem papel central no início e na ordenação dos eventos de divisão celular, regulando a progressão das fases G₁, S, G₂ e M (Knockaert et al., 2002).

As principais mudanças que ocorrem durante a maturação oocitária de várias espécies são acompanhadas por alterações na atividade das CDKs. A ativação das duas principais cinases envolvidas na fase M, denominadas MPF (fator promotor da maturação) e MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno), está correlacionada a alterações no estado de fosforilação dessas proteínas (Robert et al., 2002).

O MPF é um dímero proteico formado pela ciclina B1 (subunidade regulatória) e pela proteína p34^{cdc2} (subunidade catalítica; Sun et al., 2002), o qual promove fosforilação das laminas, que são algumas das proteínas que compõem a lâmina nuclear, com conseqüente ruptura do envelope nuclear, além de levar à fosforilação das histonas, o que desencadeia a condensação cromossômica. A ação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) na regulação dos eventos do ciclo celular pode ser desvinculada da ação do MPF em oócitos mamíferos. A MAPK é ativada pela MAP cinase (MAPKK ou MEK) que, por sua vez, é regulada pela proteína Mos.

A ativação dessas proteínas desencadeia a fosforilação de vários substratos, incluindo laminas nucleares (Dessev et al., 1991), histona HI (Langan et al., 1989), tubulina presente no fuso meiótico (Verde et al., 1990) e proteínas associadas aos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs; Centoze e Borisy, 1990; Buendia et al., 1992). A fosforilação catalisada pelo MPF e pela MAPK é tida como indutora da GVBD, que é um complexo evento que promove a ruptura do envelope nuclear e a condensação e individualização dos cromossomos (Motlik et al., 1996).

Numerosos estudos têm demonstrado a importância da sincronização do ciclo celular entre o núcleo da célula doadora e o oócito receptor no potencial de desenvolvimento de embriões reconstituídos, de forma que seja mantida a correta ploidia do embrião (Bordignon et al., 2001). Esses conceitos estão baseados principalmente nos efeitos que o MPF tem sobre o núcleo. Na sua forma ativa, o MPF regula os processos de duplicação e divisão celular, numa cascata de eventos, em que se observa rompimento do envelope nuclear, condensação dos cromossomos, reorganização do citoesqueleto e alterações na morfologia da célula, o que permite a ela entrar em mitose ou meiose (Masui, 1992).

Alguns relatos sugerem que a indução da quebra do envelope nuclear e a condensação cromossômica são essenciais para a reprogramação nuclear, sendo que esses eventos aumentariam o potencial de desenvolvimento de embriões reconstituídos. Embora existam evidências de que a utilização de citoplastos não ativados (oócitos enucleados em metáfase II) e células doadoras sincronizadas antes da fase S proporcionem melhor reprogramação nuclear e desenvolvimento embrionário (Tani e Tsunoda, 2001), não se pode descartar a possibilidade do uso de citoplastos com baixas concentrações do MPF na clonagem, uma vez que já foi demonstrada sua viabilidade, com a produção de clones a termo (Baguisi et al., 1999).

Existem relatos recentes que mostram alteração da atividade dessas cinases em técnicas de enucleação assistidas quimicamente. Tani et al. (2006) e Li et al. (2009) observaram aumento significativo da atividade do MPF após exposição de oócitos bovinos à demecolcina. Além disso, também há estudos que mostram alteração na atividade da MAPK em oócitos enucleados pelas mesmas técnicas (Lan et al., 2008; Li et al., 2009).

Técnicas de enucleação que envolvem o processo de pré-ativação, porém, levam a uma diminuição da atividade do MPF no momento da reconstituição embrionária, como, por exemplo, na técnica de enucleação em telófase (Bordignon e Smith, 1998) e nas técnicas de enucleação química que visam à extrusão de todo o material nuclear junto ao 2º CP (Ibáñez et al., 2002; Gasparrini et al., 2002; Russel et al., 2005), as quais preconizam o uso de oócitos ativados.

Considerando-se a ação das CDKs sobre o núcleo transferido, a natureza dos “fatores reprogramadores” em mamíferos ainda não está bem esclarecida. O fato de que quando células do *cumulus* fundidas com oócitos bovinos receptores em metáfase II são reprogramadas, mas não quando fundidas com oócitos ativados seis horas antes (Tani et al., 2006), indica que o MPF é um candidato a fator reprogramador. No entanto, existem controvérsias quanto à real necessidade de exposição do núcleo a um ambiente com alta atividade de MPF, sendo que outros fatores também estariam relacionados ao processo de reprogramação.

Quando núcleos somáticos são introduzidos em oócitos não ativados, ou seja, em metáfase II, o envelope nuclear rompe-se rapidamente, e os cromossomos são expostos ao citoplasma do oócito e reprogramados (Tani et al., 2003). Porém, quando núcleos somáticos são transferidos para oócitos que estão na fase S, ou seja, ativados partenogeneticamente, o envelope nuclear não se rompe, e, ainda assim, os cromossomos das células doadoras são reprogramados durante o aumento do volume nuclear (Tani et al., 2003). O que se percebe é que há um limite de tempo de ativação para que o núcleo consiga se reprogramar e não



ocorra ação prejudicial ao desenvolvimento.

Conclusões

Constata-se que, dentre os procedimentos alternativos mencionados anteriormente, a técnica de enucleação induzida quimicamente, tanto de oócitos em metáfase I como de oócitos em metáfase II ativados, é um procedimento muito atrativo por se tratar de uma técnica não invasiva, que, a princípio, exclui o processo de micromanipulação da enucleação, além de causar mínima diminuição do volume citoplasmático. Todavia, é importante ressaltar que os citoplastos receptores obtidos por essa técnica apresentam baixa atividade do MPF, sendo que ainda há controvérsias quanto à real necessidade de exposição do núcleo a um ambiente com alta atividade desse fator. Adicionalmente, a aplicação da técnica em oócitos em metáfase I tem mostrado resultados insatisfatórios em espécies domésticas, além de exigir micromanipulação quando aplicada em oócitos em metáfase II.

Acredita-se que, entre os métodos alternativos atualmente disponíveis, as técnicas de clonagem manual (“Handmade Cloning”) e de enucleação assistida quimicamente são as mais promissoras, já que ambas têm possibilitado a obtenção de animais saudáveis, com resultados próximos aos obtidos pela técnica convencional, porém com as vantagens e facilidades discutidas anteriormente. Ainda, uma associação entre essas duas técnicas se mostrou bastante interessante (Vajta, 2007), sendo a técnica de clonagem manual facilitada pelo uso do agente químico demecolcina durante o processo de enucleação.

A técnica de enucleação assistida quimicamente tem proporcionado taxas de enucleação entre 90 e 100%, eliminando a necessidade do uso de corantes específicos de DNA e possibilitado a retirada de pequena quantidade de citoplasma durante a enucleação, além de contribuir para a conservação de fatores associados ao fuso.

Portanto, a identificação e a seleção de oócitos doadores de citoplasma de maior qualidade certamente irão melhorar a eficiência da clonagem, e dentro desse contexto, as técnicas alternativas de enucleação podem contribuir imensamente. Assim, estudos adicionais que melhor caracterizem os eventos celulares e moleculares que envolvem as técnicas alternativas de enucleação terão grande valia para o avanço da TN, gerando maiores perspectivas para automação do processo, que ainda é bastante laborioso e pouco eficiente na técnica convencional.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

- Baguisi A, Behdoodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso, C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade, HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999.
- Baguisi A, Overström EW.** Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology*, v.53, p.209, 2000. Resumo.
- Barnes FL, Eyestone WH.** Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, v.33, p.141-152, 1990.
- Bartels P, Joubert J, De la Rey M, De la Rey R, Treadwell R, Callesen H, Vajta G.** Birth of Africa’s first nuclear transferred animal produced with handmade cloning. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.136, 2004. Resumo.
- Bhojwani S, Vajta G, Callesen H, Roschlau K, Kuwer A, Becker F, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R.** Developmental competence of HMDTM derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulosa cells. *J Reprod Fertil*, v.51, p.465-475, 2005.
- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC.** Factors controlling the loss of immunoreactive somatic histone H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. *Dev Biol*, v.233, p.192-203, 2001.
- Bordignon V, Smith LC.** Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, v.49, p.29-36, 1998.
- Briggs R, King TJ.** Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs’ eggs. *Proc Natl Acad Sci*, v.38, p.455-463, 1952.
- Buendia B, Draetta G, Karsenti E.** Regulation of microtubule nucleating activity of centrosomes in *Xenopus* egg extracts. *Cell Biol*, v.116, p.1431-1442, 1992.
- Burke J.** Texas A&M University/CVM. Researchers first to clone White-tailed Deer. 2003. Disponível em: <http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer_clone.shtml>. Acesso em: 3 set. 2009.



- Campbell K, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly R, Lee JH, Maalouf W.** Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.256-268, 2005.
- Centoze VE, Borisy GG.** Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. *Cell Sci*, v.95, p.405-11, 1990.
- Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP.** Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, v.20, p.366-369, 2002.
- Costa-Borges N, Paramio MT, Calderón G, Santaló J, Ibáñez E.** Antimitotic treatments for chemically assisted oocyte enucleation in nuclear transfer procedures. *Cloning Stem Cells*, v.11, p.153-166, 2009.
- Dessev G, Ivcheva-Dessev C, Bischoff J, Beach D, Goldman R.** A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles the nuclei of clam oocytes in vitro. *Cell Biol*, v.112, p.523-533, 1991.
- Dominko T, Chan A, Simerly C, Luetjens CM, Hewitson L, Martinovich C, Schatten G.** Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol Reprod*, v.62, p.150-154, 2000.
- Fulka J, Loi P, Fulka H, Ptak G, Nagai T.** Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol*, v.22, p.279-283, 2004.
- Fulka J, Moor RM.** Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.34, p.427-430, 1993.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G.** Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v.424, p.635, 2003.
- Gasparrini B, Dinnyes A, Ainslie A, Marshall C, Ritchie WA, Travers A, Wilmut I, De Sousa PA.** Attempted chemical enucleation of in vitro matured sheep oocytes after activation and their use in nuclear transfer. *Theriogenology*, v.57, p.414, 2002. Resumo.
- Gasparrini B, Gao S, Ainslie A, Fletcher J, Mc Garry M, Ritchie WA, Springbett TAJ, Overström EW, Wilmut I, De Sousa PA.** Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod*, v.68, p.1259-1266, 2003.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Berthelot V, Fromantin G, Hocquette JF, Martignat L, Renard JP.** Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology*, v.67, p.134-141, 2007.
- Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW.** Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol Reprod*, v.68, p.1249-1258, 2003.
- Ibáñez E, Sanfins A, Combelles C, Albertini DF, Overström EW.** Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterizations. *Theriogenology*, v.57, p.421, 2002. Resumo.
- Illmensee K, Hoppe PC.** Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, v.23, p.9-18, 1981.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato, J-Y, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v.282, p.2095-2098, 1998.
- Kawakami M, Tani T, Yabuuchi A, Kobayashi T, Murakami H, Fujimura T, Kato Y, Tsunoda Y.** Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.379-387, 2003.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC.** Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.130-137, 2007.
- Knockaert M, Greengard P, Meijer L.** Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci*, v.23, p.417-425, 2002.
- Kragh PM, Du Y, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Vajta G.** Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology*, v.64, p.1536-1545, 2005.
- Lan G-C, Wu Y-G, Han D, Ge L, Liu Y, Wang H-L, Wang J-Z, Tan J-H.** Demecolcine-assisted enucleation of goat oocytes: protocol optimization, mechanism investigation, and application to improve the developmental potential of cloned embryos. *Cloning Stem Cells*, v.10, p.189-201, 2008.
- Langan TA, Gautier J, Lohka M, Hollingsworth R, Moreno PN, Nurse PN, Mailer JL, Sclafani R.** Mammalian growth-associated HI histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinase controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol Cell Biol*, v.9, p.3860-3868, 1989.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS.** Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, v.436, p.641, 2005.
- Li G-P, Bunch TD, White KL, Aston KI, Meerdo LN, Pate BJ, Sessions BR.** Development, chromosomal composition, and cell allocation of bovine cloned blastocyst derived from chemically assisted enucleation and cultured in conditioned media. *Mol Reprod Dev*, v.68, p.189-197, 2004.
- Li G-P, White KL, Aston KI, Bunch TD, Hicks B, Liu Y, Sessions BR.** Colcemid-treatment of heifer oocytes



- enhances nuclear transfer embryonic development, establishment of pregnancy and development to term. *Mol Reprod Dev*, v.76, p.620-628, 2009.
- Li J, Du Y, Zhang YH.** Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.8, p.241-250, 2006.
- Masui Y.** Towards understanding control of the division cycle in animal cells. *Biochem Cell Biol*, v.70, p.920-945, 1992.
- McGrath J, Solter D.** Nuclear transplantation in the mouse embryo by microcirurgy and cell fusion. *Science*, v.220, p.1300-1302, 1983.
- Meirelles FV, Providelo FD, Perecin F, Merighe GKF, Ferreira CR, Ferraz JBS, Eler JP, Miranda MS, Chiaratti MR, de Bem THC.** Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.382-390, 2007.
- Mohamed Nour MS, Takahashi Y.** Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, v.51, p.661-666, 1999.
- Motlik J, Sutovsky P, Kalous J, Kubelka M, Moos J, Schultz RM.** Co-culture with pig membrana granulosa cells modulates the activity of cdc2 and MAP kinase in maturing cattle oocytes. *Zygote*, v.4, p.247-256, 1996.
- Munsie M.** Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. *Cloning Stem Cells*, v.4, p.121-130, 2002.
- Niemann H, Rath D, Wrenzycki C.** Advances in biotechnology: newtools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.82-89, 2003.
- Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE.** Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.3-12, 2003.
- Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, Strobecch L, Vajta G, Callesen H, Greve T.** Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. *Mol Cell Endocrinol*, v.234, p.137-143, 2005.
- Peura TT, Vajta G.** A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.257-277, 2003.
- Polejaeva IA, Chen S-H, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS.** Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v.407, p.505-509, 2000.
- Robert C, Hue I, McGraw S, Gagné D, Sirard M-A.** Quantification of cyclin B1 and p34cdc2 in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA microarrays. *Biol Reprod*, v.67, p.1456-1464, 2002.
- Rudenko L, Matheson JC.** The US FDA and animal cloning: risk and regulatory approach. *Theriogenology*, v.67, p.198-206, 2007.
- Russel DF, Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW.** Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.161-170, 2005.
- Saraiva NZ, Perecin F, Méo SC, Ferreira CR, Tetzner TAD, Garcia JM.** Demecolcine effects on microtubule kinetics and on chemically assisted enucleation of bovine oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.11, p.141-151, 2009.
- Savard C, Novak S, Saint-Cyr A, Moreau M, Pothier F, Sirard M-A.** Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.67, p.70-76, 2004.
- Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q.** Buffaloes (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, v.77, p.285-291, 2007.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M.** A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, v.415, p.859, 2002.
- Simerly C, Navara C, Hyun SH, Lee BC, Kang SK, Capuano S, Gosman G, Dominko T, Chong KY, Compton D, Hwang WS, Schatten G.** Embryogenesis and blastocyst development after somatic cell nuclear transfer in nonhuman primates: overcoming defects caused by meiotic spindle extraction. *Dev Biol*, v.276, p.237-252, 2004.
- Smith LC.** Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil*, v.99, p.39-44, 1993.
- Speemann H.** *Embryonic development and induction*. New Haven, CT: Yale University Press, 1938.
- Sun QY, Lai L, Park KW, Wu G-M, Bonk A, Cabot R, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H.** Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, v.66, p.580-588, 2002.
- Tani T, Kato Y, Tsunoda Y.** Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. *Biol Reprod*, v.69, p.1890-1894, 2003.
- Tani T, Shimada H, Kato Y, Tsunoda Y.** Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning Stem Cells*, v.8, p.61-66, 2006.
- Tani T, Tsunoda Y.** Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine



- somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod*, v.64, p.324-330, 2001.
- Tatham BG, Dowsing AT, Trounson AO.** Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. *Biol Reprod*, v.53, p.1088-1094, 1995.
- Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson AO.** Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.361-366, 2003.
- Van Thuan N, Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T.** Donor centrosome regulation of initial spindle formation in mouse somatic cell nuclear transfer: roles of gamma-tubulin and nuclear mitotic apparatus protein 1. *Biol Reprod*, v.74, p.777-787, 2006.
- Vajta G.** Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends Biotechnol*, v.25, p. 250-253, 2007.
- Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO.** Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, v.3, p.89-95, 2001.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H.** Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod*, v.68, p.571-578, 2003.
- Vajta G, Maddox-Hyttel P, Skou CT, Tecirlioglu RT, Peura TT, Lai L, Murphy CN, Prather RS, Kragh PM, Callesen H.** Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.17, p.791-797, 2005.
- Vajta G, Peura TT, Lai L, Murphy CN, Prather RS, Kragh PM, Callesen H.** Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning (HMC) in cattle and pig. *Reprod Fertil Dev*, v. 16, p. 159, 2004.
- Verde F, Labbe JC, Dorree M, Karsenti E.** Regulation of microtubule dynamics by cdc2 kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*, v.343, p.233-8, 1990.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** Full-term development of mice enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, v.394, p.369-374, 1998.
- Wagoner EJ, Rosenkrans CF, Gliedt DW, Pierson JN, Munyon AL.** Functional enucleation of bovine oocytes: effects of centrifugation and ultraviolet light. *Theriogenology*, v.46, p.279-284, 1996.
- Wells DN.** Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech Off. Int. Epiz*, v.24, p.251-256, 2005.
- Willadsen SM.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ.** A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v.301, p.1063, 2003.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H.** Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev*, v.53, p.8-18, 1999.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Keskintepe L, Martins Jr A, Sirisathien S, Brackett B, Niemann H.** Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod*, v.16, p.893-901, 2001a.
- 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. *Biol Reprod*, v.65, p.309-317, 2001b.
- Yin XJ, Kato Y, Tsunoda Y.** Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction*, v.124, p.41-47, 2002a.
- Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y.** Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod*, v.67, p.442-446, 2002b.
- Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J.** Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, v.302, p.1179, 2003.
-