



Avanços da clonagem em carnívoros

Advances in the cloning of carnivores

V.F.P. Rispoli¹, A.L. Castro, C.E. Ambrósio

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

¹Correspondência: vivianfrattirispoli@gmail.com

Resumo

As biotécnicas reprodutivas têm sido cada vez mais utilizadas como ferramentas alternativas em programas de conservação do material genético de espécies ameaçadas de extinção. O presente artigo delinea os avanços já ocorridos na reprodução de animais carnívoros, com ênfase na clonagem, não somente para a preservação das espécies em vias de extinção, como também para sua aplicação com fins terapêuticos. A clonagem animal representa um dos maiores avanços dentro da medicina veterinária, mas ainda apresenta grandes entraves para a consolidação da sua eficácia, necessitando de mais investimentos científicos na área.

Palavras-chave: animais silvestres, biotecnologia, carnívoros, reprodução, transferência nuclear.

Abstract

The reproductive biotechnologies have been increasingly used as alternative tools in conservation programs of genetic material from endangered species. This article outlines the progress that has already occurred in the reproduction of carnivorous animals, with emphasis on cloning, not only for the preservation of endangered species, but also regarding its application for therapeutic purposes. Animal cloning is one of the biggest advances in veterinary medicine, but still has major obstacles for the consolidation of its effectiveness, requiring more investment in the scientific area.

Keywords: *biotechnology, carnivores, nuclear transfer, reproduction, wild animals.*

Introdução

A extinção é um processo lento e natural que tende ao equilíbrio entre especiações, mutações e modificações das frequências dos alelos que geram novas espécies. A sobrevivência de uma espécie depende de populações mínimas viáveis (Shaffer, 1981; Soule, 1986; Brito e Fonseca, 2006), e em situações adversas o manejo das populações é necessário para obter uma mínima variabilidade genética, demográfica e ecológica, para sua manutenção e perpetuação (Cullen Jr. et al., 2003).

A exploração do meio ambiente desencadeia a diminuição da biodiversidade, ou seja, a taxa de extinção supera a de especiação. A atual perda de espécies é algo sem precedentes e pode ser irreversível segundo Primack e Rodrigues (2002), o que tornará os zoológicos bancos de reserva genômico *in vitro*, segundo Micheletti et al., 2011.

Os carnívoros são mamíferos que contam com a adaptação e a predação como características, dotados anatomicamente de estruturas desenvolvidas para encontrar, capturar e matar suas presas, contando com 126 gêneros e 286 espécies (Wonzencraft, 2005) no mundo. No Brasil, podem ser encontradas 29 espécies, das quais 10 estão ameaçadas de extinção, segundo a lista oficial do Ministério do Meio Ambiente, de maio de 2003. Desde essa época, tem sido necessário criar critérios e direcionar os recursos humanos e financeiros para priorizar o salvamento das espécies em vias de extinção, já descritos no Plano de Ação – Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros do Brasil, pelo Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação de Predadores Naturais (Cenap), do Ibama, e pela Associação Pró-Carnívoros.

Os carnívoros mantêm relações de predatismo com as outras espécies e, por isso, desempenham papel fundamental no equilíbrio dos ecossistemas. Contudo, as grandes áreas desmatadas fragmentam os nichos destes, junto com a caça indiscriminada (distúrbios antrópicos), conforme descrito por Duarte (2005). Portanto, as características biológicas e ecológicas influenciam diretamente na vulnerabilidade de cada espécie, tendo efeito direto na reprodução.

Algumas biotecnologias já são amplamente utilizadas em busca da conservação dos espécimes, principalmente *ex situ*, na tentativa de diminuir a consanguinidade e aumentar a variabilidade genética e, assim, a viabilidade da espécie. As técnicas válidas contra a extinção são inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* (Sapolsky e Krey, 1988), entretanto ainda são necessários muitos estudos para otimizar os



resultados. O objetivo do incessante esforço para a reprodução das espécies é o aumento do número de crias selecionadas viáveis, a fim de conservar a diversidade genética e diminuir o intervalo entre partos (Andrabi e Maxwell, 2007).

A conservação *ex situ*, por meio dos bancos de germoplasma, aparece como alternativa imediata de conservação de material genético em potencial (Wilson, 1997; Hiemstra et al., 2005). Os bancos podem ser abastecidos de germoplasma de populações com pequeno ou grande número de indivíduos (permitindo a variabilidade). Esse material poderá ser usado posteriormente, para auxiliar no aumento populacional se necessário. Quando a população está em pequeno número, para aumentar sua variabilidade genética, podem ser utilizados germoplasmas de indivíduos de outras regiões (Wilson, 1997).

Devido à limitada disponibilidade de espaço em zoológicos, não é possível instalar um grande número de animais de uma mesma espécie naquele local. Dessa forma, o sucesso da criopreservação pode permitir a superação do tamanho limitado de reservas de animais silvestres e dos zoológicos, por meio da manutenção da diversidade genética em botijões criogênicos (Wilson, 1997). Os bancos de germoplasma podem manter, por um longo período, sementes, gametas, embriões e células somáticas em condições viáveis de uso. Aliados aos programas de conservação, esses bancos de genes podem fornecer e receber material genético em potencial (Trounson et al., 1998).

Assim, a criopreservação é um importante instrumento para a reprodução de animais silvestres e para a manutenção de sua diversidade genética. Segundo os geneticistas Thomas Foote e Ulysses Seal, é possível manter 95% da variabilidade genética durante cerca de 400 anos, ou 50 gerações, quando se tem um manejo adequado do material genético (Wilson, 1997).

Técnicas reprodutivas

Diversas técnicas têm sido utilizadas na reprodução de carnívoros (Tab. 1), tais como: inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), transferência de embriões (TE) e transferência nuclear (TN).

A clonagem - transferência nuclear

A clonagem (transferência nuclear -TN) é uma técnica que tem por finalidade produzir um organismo com características físicas e biológicas idênticas à de outro ser vivo; para tal, o material genético proveniente de qualquer célula somática de um indivíduo é adicionado a um oócito não fecundado e enucleado, formando o zigoto a partir de um núcleo doador para um citoplasma receptor por meio da fusão de membranas plasmáticas por eletrofusão (Bordignon et al., 2008), portanto não há necessidade dos gametas, ou células reprodutivas. Assim, tem-se a formação do embrião, que é mantido em estufa e em meio de cultivo especial para a posterior implantação em uma receptora compatível. Segundo Fernandes et al. (2012), a clonagem agrega valor aos animais pois permite a seleção e a transmissão, de forma efetiva, de características desejadas.

Em 1881, Illmensee e Hoppe efetuaram a primeira transferência nuclear com células embrionárias em camundongos, sendo os pioneiros na clonagem em mamíferos. Já a utilização da clonagem para a preservação do material genético de animais em vias de extinção foi realizada primeiramente no último exemplar de um bovino da raça Enderby Island, proveniente da Nova Zelândia. Outros clones desse animal foram produzidos e cruzados com animais de outras raças, mas os oócitos receptores e as células doadoras foram provenientes de animais da mesma espécie, o que pode ser uma limitação na clonagem dos animais selvagens em vias de extinção, pois os oócitos das espécies similares podem não ser disponíveis. Mas existe a técnica conhecida por TN interespecie, utilizada quando não há oócitos suficientes (ou são limitados) ou a maturação *in vitro* dos embriões é incompleta (Murakami et al., 2005) e efetuada com o oócito receptor de uma espécie diferente daquela do doador do núcleo, o que viabiliza novas fronteiras reprodutivas.

Já o primeiro carnívoro selvagem clonado foi o gato-selvagem-africano, nascido em Nova Orleans de uma gata doméstica, em 06 de agosto de 2003 (Gómez et al., 2004). O animal foi criado por meio da utilização do material genético congelado de um gato-selvagem-africano, que também nasceu de uma gata doméstica, porém como resultado da primeira bem-sucedida transferência de embrião congelado pós-fertilização *in vitro*, em novembro de 1999.

Uma facilidade da técnica da clonagem é a relativa simplicidade com que se obtém o material genético. A Tab. 2 mostra as diferentes fontes de obtenção das células dos doadores.



Tabela 1. Estudos envolvendo as biotécnicas reprodutivas utilizadas em carnívoros.

Espécie	IA com sêmen fresco ou descongelado	IA com sêmen descongelado	IA por laparoscopia	Tratamento com gonadotrofinas coriônicas equinas ou humanas	FIV + TE	Clonagem
Tigre siberiano (<i>Panthera tigris altaica</i>)			Donoghue et al., 1993			
Gato doméstico (<i>Felis catus</i>)	Sojka et al., 1970; Platz et al., 1978; Howard et al., 1992; Tsutsui et al., 2000	Platz et al., 1978; Tsutsui et al., 2000; 2003	Howard et al., 1992			Shin et al., 2002; Westhusin et al., 2003
Gato selvagem africano (<i>Felis silvestris lybica</i>)						Gómez et al., 2004
Gato selvagem asiático (<i>Felis sylvestris ornata</i>)					Pope et al., 1993	
Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	Swanson et al., 1996; Swanson e Brown, 2004; Pelican et al., 2006					
Gato-maracajá (<i>Leopardus wiedi</i>)	Swanson e Brown, 2004; Pelican et al., 2006					
Gato do deserto indiano (<i>Felis silvestris</i>)					Pope et al., 1989	
Gato mourisco (<i>Puma yagouaroundi</i>)	Pope et al., 1998	Pope et al., 1998				
Gato leopardo (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	Barone et al., 1994; Swanson et al., 1996	Wildt et al., 1992; Swanson et al., 1996				Barone et al., 1994
Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	Howard et al., 1992			Donoghue et al., 1990; 1996		Donoghue et al., 1990; 1993
Leopardo (<i>Felis bengalensis</i>)	Dresser et al., 1982		Wildt et al., 1992			Goodrowe et al., 1989
Puma (<i>Felis concolor</i>)	Moore et al., 1981		Barone et al., 1994	Barone et al., 1994; Swanson et al., 1996		Miller et al., 1990
Pantera nebulosa (<i>Neofelis nebulosa</i>)	Donougue et al., 1993		Howard et al., 1996	Swanson et al., 1996		
Leopardo das neves (<i>Panthera unica</i>)	Howard et al., 1996		TL Roth e DE Wildt (unpublished), citados por Donoghue et al., 1996	Swanson et al., 1996		Roth et al., 1994
Jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	Roth et al., 1997	Howard et al., 1996; Swanson et al., 1996	Swanson et al., 1995; 1996; Howard et al., 1996	Swanson et al., 1996; Paz et al., 2010		
Tigre de Sumatra (<i>Panthera tigris sumatrae</i>)	Tilson e Brady 1992			Tilson e Brady 1992		
Guepardo (<i>Acinonyx jubatus</i>)	Wildt et al., 1992; Howard et al., 1997	Howard et al., 1997	Howard et al., 1992	Howard et al., 1992; Swanson et al., 1996	Howard et al., 1992	
Cão doméstico (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Spallanzani, 1784, citado por Foote, 2002			Donougue et al., 1993		Lee et al., 2005; Park et al., 2010
Lobo cinzento (<i>Canis lupus</i>)						Oh et al., 2008



Tabela 2. Diferentes fontes de obtenção de células doadoras para a técnica da clonagem.

Fonte	Autoria
Células embrionárias pré-implantação	Willadsen, 1986
Células embrionárias diferenciadas	Campbell et al., 1996
Fibroblastos fetais	Wilmut et al., 1997
Células de oviduto	Kato et al., 1998
Células de glândulas mamárias	Wilmut et al., 1997
Fibroblastos da pele	Kato et al., 2000
Células do <i>cumulus</i>	Kato et al., 1998; Wakayama et al., 1998
Células de Sertoli	Ogura et al., 2000; Yanagimachi, 2002
Células testiculares fetais	Watagama e Yanagimachi, 2001
Células da granulosa mural	Wells et al., 1999
Células-tronco embrionárias	Wakayama e Yanagimachi, 1999
Leucócitos	Galli et al., 1999

Problemas associados com a clonagem por transferência nuclear

Apesar de a técnica de transferência nuclear ter sido realizada em diversos laboratórios pelo mundo, o sucesso da produção dos clones é baixo. Existem, também, frequentes variações nos resultados, embora sejam utilizadas as mesmas condições de clonagem, tais como: tipo de célula doadora de núcleo, preparação dos oócitos, ativação e cultivo dos embriões.

Devem-se considerar questões básicas que podem causar problemas para a eficiência na clonagem, como o cultivo laboratorial do embrião, na fase pré-implantação, o tempo de micromanipulação, o meio de cultivo, a temperatura adequada, as taxas de oxigênio/dióxido de carbono, a desmetilação das células autossômicas para reativação da embriogênese no feto, o que gera reprogramação nuclear falha, as alterações placentárias e as disfunções perinatais (Guimarães et al., 2012).

A menor taxa de apoptoses nas regiões centrais dos placentomas (expressão inadequada de genes como BAX, BCL2 e GAPDH) e a maior atividade de proliferação nas placentas em final de gestação (Rici et al., 2009), bem como o fato de que no parto e no pré-parto o número de células binucleadas (responsáveis pela síntese de progesterona na placenta, resultado da fusão de células materna e fetal) não diminui (Wooding, 1984), são algumas das alterações responsáveis pelas complicações. Em ruminantes, há ainda o atraso no desenvolvimento do trofoblasto, o número reduzido de placentônios, o desenvolvimento vascular comprometido, a menor expressão de fatores (VEGF e bFGF), a menor concentração de progesterona proveniente da placenta e as anormalidades dos envoltórios fetais (Guimarães et al., 2012).

As alterações placentárias que geram a perda fetal seriam de três tipos segundo Miglino (2004) e Bordignon e Smith (2008): a) subdesenvolvimento do epitélio coriônico da placenta, portanto menor número de vasos sanguíneos no alantoide; b) diminuição do número de cotilédones, promovendo diminuição nas trocas materno-fetal; c) diminuição do número dos cotilédones e aumento de tamanho destes com edema dos envoltórios fetais.

Outras importantes complicações que geram obstáculos ao desenvolvimento pós-natal dos animais clonados seriam aumento das dimensões do cordão umbilical, alterações imunológicas, malformações congênitas, problemas de retenção placentária, hidroalantoide e macrosomia ou síndrome do feto gigante (observada em 50%, relacionada ao aumento da glicoproteína PSP60 produzida pelas células binucleadas; Heyman et al., 2002; Miglino, 2004; Landim-Alvarenga, 2006; Guimarães et al., 2012).

Disfunções cardiorrespiratórias, hepáticas, renais, articulares e alterações multissistêmicas geram a sobrevivência de apenas 10% dos clones (Guimarães et al., 2012). Esta expectativa pode ser reduzida para 6 a 8% dos clones nascidos vivos, segundo Miglino (2004). De acordo com Santos et al. (2010), 30,7% dos neonatos apresentam anomalias no aparelho locomotor, 46,1% possuem alterações cardíacas 100% padrão cianótico, incompleta cicatrização do cordão umbilical e hidrotórax serofibroso.

Considerações finais

A utilização da clonagem como instrumento alternativo para a preservação do material genético das espécies ameaçadas de extinção e para fins terapêuticos representa grande avanço para a medicina veterinária, mas são necessários estudos complementares, não somente para as espécies carnívoras, mas também para as outras espécies animais, a fim de se identificarem as bases dos problemas que ainda tornam a técnica deficitária.

Referências

- Andrabi SMH, Maxwell WMC. A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.
- Barone MA, Wildt DE, Byers AP, Roelke ME, Glass CM, Howard JG. Gonadotrophin dosage and timing of



- anaesthesia for laparoscopy artificial insemination in the puma (*Felis concolori*). *J Reprod Fertil*, v.101, p.103-108, 1994.
- Bordignon V, Smith LC.** Clonagem animal por transferência nuclear. In: Gonçalves PB D, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal*. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.347-364.
- Brito D, Fonseca GAB.** Evaluation of minimum viable population size and conservation status of the long-furred woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus*: an endemic marsupial of the Atlantic Forest. *Biodiversity Conservation*, v.15, p.1713-1728, 2006.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, n.6569, p.64-66, 1996.
- Cullen Jr L, Rudran R, Valladares-Padua C.** Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo silvestre. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2003.
- Donoghue AM, Byers AP, Johnston LA, Armstrong DL, Wildt DE.** Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (*Panthera tigris*). *J Reprod Fertil*, v.107, p.53-58, 1996.
- Donoghue AM, Johnston LA, Armstrong DL, Simmons LG, Wildt DE.** Birth of a siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. *J Zoo Wildl Med*, v.24, p.185-189, 1993.
- Donoghue AM, Johnston LA, Seal US, Armstrong DL, Tilson RL, Wolf P, Petrini K, Simmons LG, Gross T, Wildt DE.** In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod*, v.43, p.733-743, 1990.
- Duarte JMB.** Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres; o exemplo dos cervídeos. *Agrociencia*, v.9, p.541-544, 2005.
- Fernandes VM, Aloia TPA, Will SEAL, Ambrósio CE, Francioli ALR, Miglino MA, Rici REG.** Comparação da imunolocalização de receptores de progesterona em placentas de bovinos normais e clonados. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, p.194-198, 2012.
- Foote RH.** The history of artificial insemination: selected notes and notables. *J Anim Sci Electr*, suppl 2, 2002. Disponível em: <https://www.asas.org/docs/publications/footehist.pdf?sfvrsn=0>.
- Galli C, Duchi R, Moor R, Lazzari G.** Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*, v.1, p.161-170, 1999.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons L, Harris RF, Cole A, Godke A, Dresser BL.** Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.
- Goodrowe KL, Miller AM, Wildt DE.** In vitro fertilization of gonadotropin-stimulated leopard cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. *J Exp Zool*, v.252, p.89-95, 1989.
- Guimarães CF, Meireles MG, Oliveira BMM, Pogliani FC, Fernandes CB.** Clonagem em ruminantes: anomalias placentárias e disfunções perinatais. *Vet Foco*, v.9, n.2, p.100-109, 2012.
- Heyman P, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP.** Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*, v.66, p.6-13, 2002.
- Hiemstra SJ, van der Linde T, Woelders, H.** The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: *The role of biotechnology*, 2005, Turin, Italy. Rome: FAO, 2005. p.25-35.
- Howard JG, Byers AP, Brown JL, Barret SJ, Evans MZ, Schwartz RJ, Wildt DE.** Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biol*, v.15, p.55-70, 1996.
- Howard JG, Donoghue AM, Barone KL, Goodrowe E, Blumer E, Snodgrass K, Starnes D, Tucker M, Bush M, Wildt DE.** Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wildl Med*, v.23, p.288-300, 1992.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v.282, n.5396, p.2095-2098, 1998.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y.** Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, v.120, p.231-237, 2000.
- Landim-Alvarenga FC.** Reconhecimento materno do conceito e início da placentação. In: Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.22-39.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Fibrianto Y, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS.** Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, v.436, n.7051, p.641, 2005.
- Micheletti T, Cubas ZS, Moraes W, Oliveira MJ, Kozicki LE, Weiss RR, Moreira N.** Reprodução assistida em felídeos selvagens: uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.408-417, 2011.
- Miglino MA.** Clonagem animal e placentação. *Acta Sci Vet*, supl.32, p.75-78, 2004.
- Miller AM, Roelke ME, Goodrowe KL, Howard JG, Wildt DE.** Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J Reprod Fertil*, v.88, p.249-258, 1990.
- Murakami M, Otoi T, Wongrikeao P, Agung B, Samuu R, Suzuki T.** Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. *Cloning Stem Cells*, v.7, p. 77-81, 2005.
- Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F, Matsuda J.**



- Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*, v.62, p.1579-1584, 2000.
- Oh HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC.** Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected post-mortem. *Theriogenology*, v.70, p.638-647, 2008.
- Park JE, Kim MK, Kang JT, Oh HJ, Hong SG, Kim DY, Jang G, Lee BC.** Growth and hematologic characteristics of cloned dogs derived from adult somatic cell nuclear transfer. *Cellular Reprogram*, v.12, p.141-150, 2010.
- Paz RCR, Adania CH, Barnabe VH, Barnabe RC.** Detecção de estro em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) utilizando citologia vaginal. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.62, p.1409-1414, 2010.
- Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL.** Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.221-236, 1998.
- Primack RB, Rodrigues E.** *Biologia da conservação*. Londrina: Planta, 2001.
- Rici REG, Facciotti PR, Ambrósio CE, Maria DA, Kfoury Jr. JR, Bertolini M, Miglino MA.** Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placenta. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.29-38, 2009.
- Roth TL, Howard JG, Donoghue AM, Swanson WF, Wild DE.** Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil*, v.101, p.563-569, 1994.
- Santos CR, Grandi F, Miglino MA, Meirelles FV, Maiorka PC.** Patologia de neonatos bovinos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas - clonagem. *Braz J Vet Res Anim*, v.47, p.447-453, 2010.
- Sapolsky RM, Krey LC.** Stress induced suppression of luteinizing hormone concentrations in wild baboons: role of opiates. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* v.66, p.722-726, 1988.
- Shaffer ML.** Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, v.31, p.131-134, 1981.
- 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, n.6874, p.859, 2002.
- Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE.** Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Lab Anim Care*, v.20, p.198-204, 1970.
- Soule ME.** *Conservationbiology: the science of scarcity and diversity*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1986. 584p.
- Swanson W, Howard JG, Roth TL, Kaemmerer K, Alvarado T, Burton M, Starnes D, Sims L, Collins D, Wildt DE.** Laparoscopic intrauterine insemination in the ocelot (*Felis pardalis*) after ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Theriogenology*, v.43, p.331, 1995.
- Trounson A, Gunn I, Lacham-Kaplan O, Lewis I, McKinnon A, Peura T, Shaw J.** Manipulation of development: opportunities for animal breeding. In: Laurice A, Gaudolfi F, Enne G, Gianaroli L (Ed.). *Gametes: Development and Function*. Rome: Serono Symposia, 1998. p.485-499.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T.** Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1247-1251, 2000
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T.** Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, v.65, p.397-399, 2003.
- Wakayama T, Yanagimachi R.** Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genet*, v.22, p.127-128, 1999.
- Wakayama T, Yanagimachi R.** Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, v.58, p.376-383, 2001.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M.** Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, v.394, n.6691, p.369-374, 1998.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR.** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, v.60, p.996-1005, 1999.
- Westhusin ME, Shin TY, Pryor J, Rugila J, Kraemer DC.** Cloning cats by nuclear transplantation. *Patente US2003/0229909 A1*. 2003.
- Wild DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard JG.** Embryogenesis in conservation biology - or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, v.37, p.161-184, 1992.
- Willadsen SM.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
- Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, n.6619, p.810-813, 1997.
- Wilson EO.** *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- Wonzencraft WC.** Order Carnivora. In: Wilson DE, Reed DM (Ed.). *Mammal Species of the World*. 3.ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.532-628.
- Wooding FBP.** Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am J Anat*, v.170, p.233-250, 1984.
- Yanagimachi R.** Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol*, v.187, p.241-248, 2002.