

Brasília da Cerrados: primeiro bovino clonado utilizando células-tronco mesenquimais do tecido adiposo



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 330

Brasília da Cerrados: primeiro bovino clonado utilizando células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

*Carolina Gonzales da Silva
Sonia Nair Bão
Heidi Christina Bessler
Tereza Cristina Cardoso
Luiz Osvaldo da Fonseca
Álvaro Moraes da Fonseca Neto
Sebastião Dias Godoy
George Henrique Martins
Elisa Ribeiro da Cunha
Carlos Frederico Martins*

Exemplar desta publicação disponível gratuitamente no link:
http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versaomodelo/html/2016/doc/doc_330.shtml

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa Postal 08223, CEP 73310-970 Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898, Fax: (61) 3388-9879
www.embrapa.br/cerrados
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Marcelo Ayres Carvalho*
Secretária executiva: *Marina de Fátima Vilela*
Secretárias: *Maria Edilva Nogueira*
Alessandra Silva Gelape Faleiro

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*
Revisão de texto: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*
Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares Araújo*
Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*
Capa: *Wellington Cavalcanti*
Foto(s) da capa: *Breno Rodrigues Lobato*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*
Alexandre Moreira Veloso

1ª edição

1ª impressão (2016): 100 exemplares
Edição online (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Cerrados

B823 Brasília da Cerrados: primeiro bovino clonado utilizando células-tronco mesenquimais do tecido adiposo / Carolina Gonzales da Silva... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2016.

34 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081, 330).

1. Clonagem. 2. Clone nuclear. 3. Bovino. 4. Transferência nuclear. I. Silva, Carolina Gonzales da. II. Série. III. Embrapa Cerrados.

636.0821 – CDD 21

© Embrapa 2016

Autores

Carolina Gonzales da Silva

Médica-veterinária, doutoranda da Universidade de Brasília, bolsista da Capes/CNPq

Sonia Nair Bão

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, professora da Universidade de Brasília, Brasília, DF

Heidi Christina Bessler

Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Tereza Cristina Cardoso

Médica-veterinária, doutora em Ciências Biológicas, professora da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Araçatuba, SP

Luiz Osvaldo da Fonseca

Médico-veterinário, analista da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Álvaro Moraes da Fonseca Neto

Médico-veterinário, mestre em Produção Animal, analista da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Sebastião Dias Godoy

Economista, analista da Embrapa Cerrados,
Planaltina, DF

George Henrique Martins

Médico-veterinário, mestre em Ciência Animal,
Brasília, DF

Elisa Ribeiro Da Cunha

Médica-veterinária, mestre em Biologia Animal,
extensionista da Emater-DF, Brasília, DF

Carlos Frederico Martins

Médico-veterinário, doutor em Reprodução Animal,
pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Apresentação

A clonagem por transferência nuclear (TN) ainda é uma técnica menos eficiente que as biotécnicas de transferência de embriões e fecundação in vitro em bovinos. Um dos fatores que deve ser melhorado é a fonte de células doadoras de núcleo. Quanto menos diferenciadas forem as células, tais como células-tronco multipotentes, mais facilmente elas terão o núcleo reprogramado pelo citoplasma receptor e, conseqüentemente, poderão gerar um novo indivíduo saudável.

Células do tecido adiposo (CTA) são fontes de células multipotentes que ainda não haviam sido testadas para a produção de embriões bovinos pela técnica de clonagem por TN.

Dessa forma, esta publicação visa descrever a metodologia e apresentar os resultados inovadores do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cerrados, com o uso de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo, na produção de embriões, gestações e nascimento da bezerra Brasília da Cerrados.

Cláudio Takao Karia
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução.....	9
Transferência Nuclear (TN)	10
Reprogramação Epigenética na TN	15
Tipos Celulares	18
Células-tronco Mesenquimais.....	20
Nascimento de Bovino Saudável Proveniente de Clonagem com Células-tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo.....	21
Isolamento das células do tecido adiposo.....	22
Caracterização das células-tronco mesenquimais.....	24
Imunocitoquímica	24
Citometria de fluxo	25
Diferenciação em três linhagens celulares.....	26
Transferência nuclear com as células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo.....	27
Considerações Finais	29
Referências	29
Abstract	34

Brasília da Cerrados: primeiro bovino clonado utilizando células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

*Carolina Gonzales da Silva; Sonia Nair Bão;
Heidi Christina Bessler; Tereza Cristina Cardoso;
Luiz Osvaldo da Fonseca; Álvaro Moraes da
Fonseca Neto; Sebastião Dias Godoy;
George Henrique Martins; Elisa Ribeiro da Cunha;
Carlos Frederico Martins*

Introdução

Originalmente, os animais clonados foram produzidos para gerar um grande número de animais geneticamente superiores para utilização na pecuária (WOLF et al., 1998). Dessa forma, esses animais melhorados ajudariam na propagação de genes de interesse no rebanho comercial, contribuindo para o melhoramento genético nas diversas espécies e raças de animais de produção. Mas, com o passar do tempo, um intenso interesse científico no campo da transferência nuclear foi gerado, principalmente na engenharia de animais transgênicos, para várias propostas biomédicas e na pecuária (WELLS et al., 1999).

Se por um lado, há uma extensa variabilidade nas taxas de desenvolvimento de embriões clonados, por outro lado, a taxa de nascimento de bezerros saudáveis é frequentemente baixa. Assim sendo, se faz necessário o aprimoramento nos procedimentos e nos materiais biológicos utilizados na clonagem por transferência de núcleos (TN). Nesse contexto, a escolha do tipo celular doador de núcleo parece ser importante para aumentar a eficiência da técnica e pode ter um grande efeito na progressão do desenvolvimento embrionário e fetal (MIYOSHI et al., 2003). A correta reprogramação nuclear e, conseqüentemente, a prevenção de erros epigenéticos têm sido sugeridas como indispensáveis para melhorar a taxa de sucesso da

clonagem animal (WANG et al., 2011). Isso faz da disponibilidade de células cujos núcleos são capazes de sofrer reprogramação epigenética um importante pré-requisito para a TN e a célula doadora um componente crucial dessa biotecnologia (FU et al., 2008; WANI et al., 2010).

Ocorrem diferenças significantes na capacidade de diversas linhagens celulares em produzir embriões, e o núcleo das células que são menos diferenciados parece ser mais apto em suportar um completo desenvolvimento embrionário que as células completamente diferenciadas (HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2002). Nesse sentido, células multipotentes, tais como os blastômeros embrionários, e células-tronco embrionárias promovem um maior desenvolvimento de embriões clonados quando comparados com células somáticas (CAMPBELL et al., 2007). Resultados de alguns experimentos em camundongos (WAKAYAMA et al., 1998) sugerem que o estado não diferenciado das células doadoras pode aumentar a taxa de nascimentos de animais clonados. Dessa forma, células-tronco mesenquimais (CTM) surgem como uma fonte promissora para ser utilizada na TN.

CTM são células-tronco multipotentes com características bem definidas e intrínseca capacidade de autorregeneração e diferenciação em diversos tipos celulares funcionais (BAKSH et al., 2004).

O objetivo deste documento é descrever a metodologia e apresentar os resultados inovadores do Laboratório de Reprodução Animal do Centro de Tecnologias em Raças Zebuínas Leiteiras (CTZL), com o uso de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo, na produção de embriões, gestações e nascimento da bezerra Brasília da Cerrados por meio de clonagem por transferência de núcleos.

Transferência Nuclear (TN)

A clonagem por transferência nuclear (TN) envolve a transferência de um núcleo celular para o citoplasma recipiente de um ovócito enucleado

(citoplasto) ou de um zigoto (CAMPBELL et al., 1993; WOLF et al., 1998; CAMPBELL, 1999), em que o genoma da célula somática doadora de núcleo poderá sofrer reprogramação. Ovócitos no estágio de metáfase II da meiose são os recipientes mais apropriados para a produção de embriões clonados viáveis de mamíferos (NIEMANN; LUCAS-HAHN, 2012).

Portanto, para a produção de um animal clonado são necessários dois componentes básicos e essenciais: o citoplasma receptor e a célula doadora do material genético que se deseja clonar.

Normalmente, os protocolos de TN envolvem os seguintes passos técnicos: (1) enucleação do ovócito recipiente; (2) preparação e transferência do núcleo das células doadoras; (3) fusão dos dois componentes; (4) ativação do complexo reconstruído; (5) cultivo temporário dos embriões reconstruídos; e (6) transferência para uma receptora ou armazenagem em nitrogênio líquido (NIEMANN et al., 2008) (Figura 1).

Espera-se que, ao final do período de 7 dias de cultivo em condições laboratoriais, sejam obtidos embriões em estágio de blastocistos e que estes estejam aptos a serem transferidos para receptoras sincronizadas, também aptas a receber um embrião de sete dias.

A competência de desenvolvimento do blastocisto produzido por transferência nuclear tem sido demonstrada pela produção de animais vivos (WILMUT et al., 1997; WAKAYAMA et al., 1998), que é um forte argumento que uma atividade reprogramadora do núcleo celular está presente no citoplasma, capaz de alterar completamente a programação das células adultas, mas a natureza desses fatores não foi precisamente caracterizada (VAJTA; GJERRIS, 2006). Wilmut et al. (1997) afirmam que o nascimento do primeiro mamífero proveniente de TN utilizando uma célula somática adulta confirma que a diferenciação daquela célula não envolveu a modificação irreversível do material genético requerido para o desenvolvimento a termo.

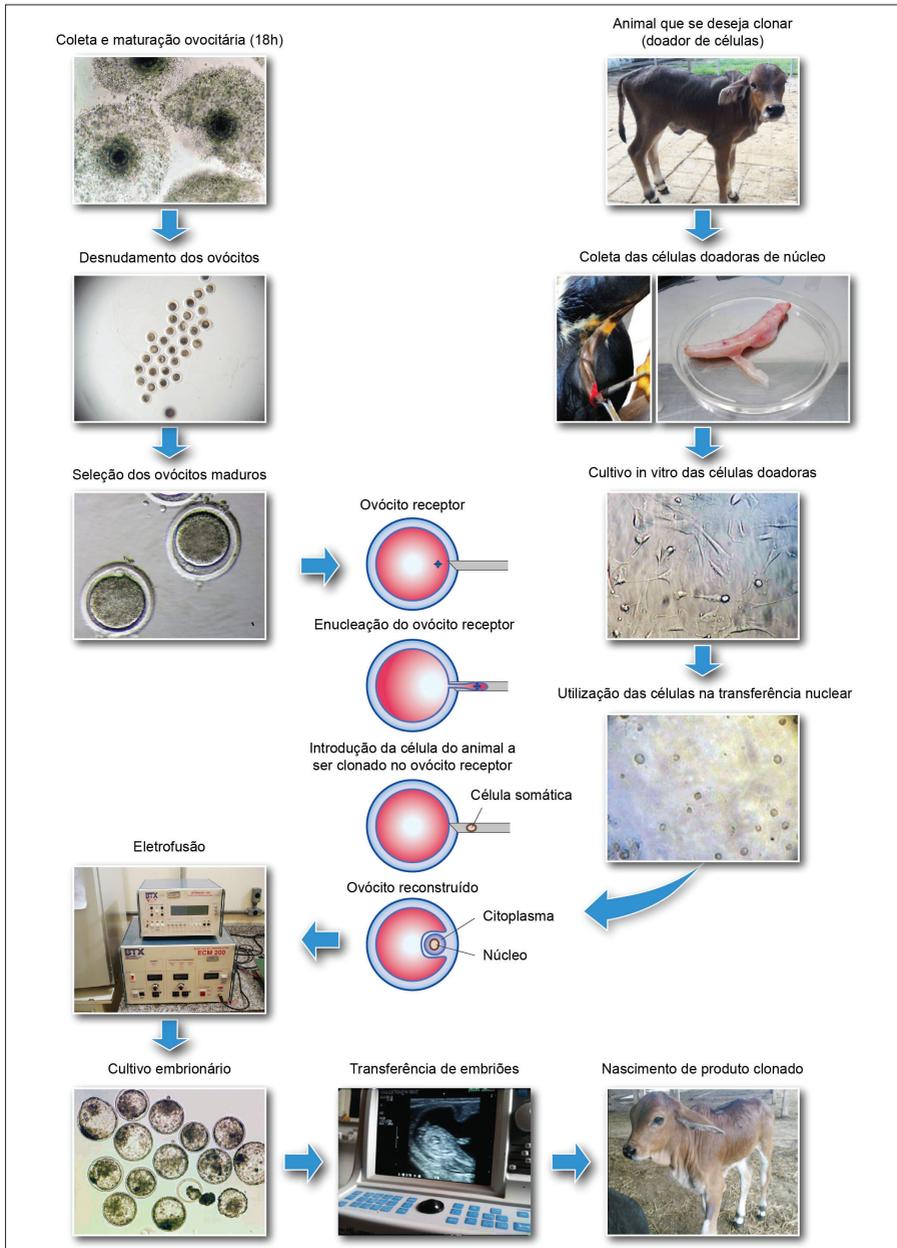


Figura 1. Sequência de eventos para produção de um clone bovino por Transferência de Núcleos.

Apesar de a TN ser o modo mais eficiente de gerar animais transgênicos (VAJTA; GJERRIS, 2006), assim como cópias de animais de produção de alto valor genético, a produção eficiente de clones nascidos vivos permanece como maior obstáculo para aplicações comerciais dessa tecnologia (WANI et al., 2010).

Embora seja claramente possível produzir descendentes clonados de células diferenciadas de mamíferos por TN, a taxa de sucesso global da técnica ainda é baixa. Nos trabalhos mencionados por Heyman et al. (2002), apenas 0% a 5% dos embriões transferidos resultaram em um desenvolvimento a termo. Esse fato se deve principalmente à alta frequência de impedimento de desenvolvimento pós-implantacional, que pode ocorrer após a transferência de blastocistos aparentemente normais (HEYMAN et al., 2002).

Apesar do grande potencial de aplicação da TN, vários fatores permanecem limitantes para o aumento da eficiência da técnica para a produção de animais saudáveis, pois somente pequena fração dos embriões reconstruídos conseguem se desenvolver a termo (CHENG et al., 2011).

A extensa variabilidade nas taxas de desenvolvimento de embriões clonados e as baixas taxas de desenvolvimento da prole requerem melhorias nos procedimentos e no material biológico utilizado para produzir os embriões clonados, tais como, a célula doadora e o citoplasma recipiente, que podem ter um grande efeito na progressão do desenvolvimento (MIYOSHI et al., 2003).

Zheng et al. (2009) trabalhando com TN em suínos, sugerem que muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento de embriões clonados, entre eles o tipo da célula doadora, ovócitos recipientes, métodos de ativação e de fusão, e sistema de cultivo in vitro. Outros fatores incluem o estágio do ciclo celular da célula recipiente, o estágio do ciclo celular e o status de diferenciação da célula doadora de núcleo (CAMPBELL, 1999).

De uma forma mais geral, Miyoshi et al. (2003) apresentaram duas abordagens que podem ser seguidas para aumentar a eficiência da clonagem: (1) esclarecer o mecanismo de reprogramação do núcleo doador e os fatores que afetam a progressão desse processo durante o desenvolvimento, o que permitiria aumentar o número de embriões clonados com núcleo reprogramado funcionalmente; e (2) selecionar ovócitos recipientes e células doadoras que produzirão embriões clonados com núcleo reprogramado funcionalmente.

Muitos trabalhos demonstram a importância do tipo celular na eficiência da clonagem e muitos pesquisadores têm verificado que certos tipos de células doadoras produzem taxas de nascimento de prole saldável mais elevadas após a transferência dos blastocistos clonados (INOUE et al., 2003). O desenvolvimento normal pré e pós-natal até a maturidade dos animais clonados é a medida definitiva da TN bem sucedida e a confirmação final do valor dessa tecnologia (GÓMEZ et al., 2006).

Teoricamente qualquer célula pode ser reprogramada com sucesso, entretanto, diferenças existem com relação à eficiência da clonagem entre os diferentes tipos de células somáticas. Células fetais, especificamente fibroblastos fetais, são frequentemente usados na clonagem em razão de terem uma menor quantidade de mutações e maior capacidade proliferativa do que células somáticas adultas (NIEMANN; LUCAS-HAHN, 2012). Levando isso em consideração, o uso de células fetais, como do cordão umbilical e amnióticas, representa uma alternativa vantajosa. Ademais, a utilização de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo é uma alternativa atraente para utilização na clonagem por transferência nuclear de animais adultos.

A utilização do tecido adiposo como fonte de células-tronco vem sendo muito estudada em humanos. Células-tronco são raras no tecido adulto e de difícil isolamento e manutenção *ex vivo*. O conceito do tecido adiposo como uma fonte pós-natal de células para as terapias regenerativas em humanos é atraente, pois elas são abundantes e acessíveis. A gordura subcutânea pode ser coletada seguindo

procedimentos minimamente invasivos (VALLÉE et al., 2009) e permite a extração de grande volume de tecido com limitada morbidade (RODRIGUEZ et al., 2005).

A demonstração de que as células derivadas do tecido adiposo têm capacidade de participar na regeneração tecidual após transplante em modelos animais (RODRIGUEZ et al., 2004) e potencial para produção de uma ampla variedade de substitutos autólogos para a engenharia de tecidos (VALLÉE et al., 2009) realça o conceito de que o tecido adiposo é uma nova fonte de células-tronco. Mesmo com tantas vantagens apresentadas para a utilização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, sua utilização na clonagem animal ainda é muito recente (PICOU, 2009; REN et al., 2014).

Reprogramação Epigenética na TN

O termo epigenética refere-se a um conjunto de mecanismos e fenômenos que definem o fenótipo de uma célula sem afetar o seu genótipo (SASAKI; MATSUI, 2008). Uma outra definição elaborada por Shi et al. (2003) define o termo como alterações hereditárias, porém reversíveis, na expressão gênica que ocorrem sem alterações na sequência de DNA. Pode-se considerar que esse é o ponto chave da clonagem por transferência nuclear de células somáticas (IGUMA, 2005).

De uma maneira mais prática, basta pensar nos vários tipos celulares de um organismo multicelular superior, derivado de um ovócito fertilizado. Todos os tipos celulares têm basicamente um genoma idêntico, no entanto, cada uma dessas células apresenta padrão de expressão gênica particular, sendo, conseqüentemente, funcionalmente e morfológicamente diferentes (SHI et al., 2003). Isso se deve às marcas epigenéticas que cada tipo celular carrega em seu DNA, adquiridas durante o desenvolvimento embrionário e reprogramados durante meiose para produção de gametas.

A reprogramação epigenética é um passo mais complexo que, segundo Hiragi e Solter (2005), define o sucesso da TN, pois é o processo que o núcleo doador deve sofrer para se tornar totipotente, em que o padrão de expressão de uma célula diferenciada é abolido e o novo padrão de expressão gênica embrionário é estabelecido, a fim de direcionar o desenvolvimento embrionário e fetal (NIEMANN; LUCAS-HAHN, 2012). Para isso, o núcleo transferido deve ativar genes importantes para o desenvolvimento embrionário inicial e também suprimir genes associados à diferenciação, que eram transcritos na célula doadora original (JAENISCH et al., 2002).

Vários mecanismos epigenéticos são descritos atuando diretamente no DNA ou nas proteínas histonas. A unidade fundamental da cromatina nos eucariontes é o nucleossomo, formado pelas proteínas histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4). As extremidades N-terminais de todas as histonas, com exceção da H1, se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer várias modificações, podendo assim alterar a estrutura da cromatina (Figura 2). Está claro que as histonas são componentes integrais e dinâmicos da maquinaria responsável pela regulação da transcrição gênica (STRAHL; ALLIS, 2000).

Com relação às histonas, as modificações mais estudadas são a acetilação, a metilação e a fosforilação (STRAHL; ALLIS, 2000), e essas alterações ligadas a metilação do DNA são essenciais para a correta regulação dos processos nucleares vitais, tais como, a transcrição, a replicação, a reparação e a recombinação do DNA (JASENCAKOVA et al., 2003).

Já a modificação epigenética por meio da metilação do DNA em mamíferos ocorre predominantemente em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG) (DEAN et al., 2001), pela adição de um grupo metil (CH₃) na posição 5' das bases nitrogenadas citosinas adjacentes às guaninas na molécula de DNA. Além de regular processos vitais juntamente com as alterações nas histonas, a metilação do DNA desempenha também um papel importante na inativação do cromossomo X, no imprinting genômico, no silenciamento de alguns genes e na ativação de outros

(REIK; DEAN, 2001) e está envolvida em grande número de funções-chave no genoma (DEAN et al., 2001).

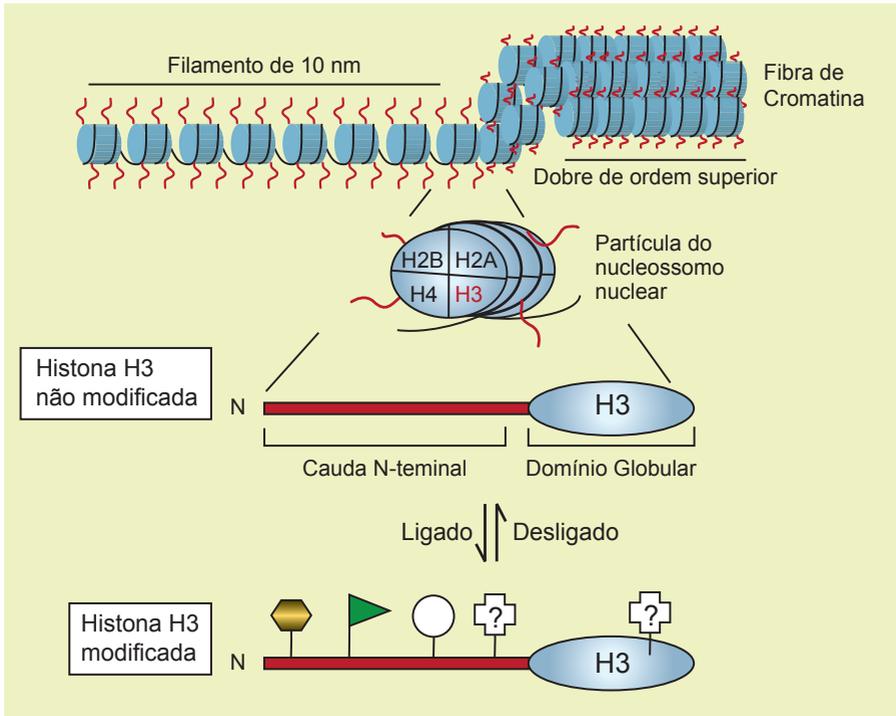


Figura 2. Organização da cromatina e cauda da histona H3. Assim como as caudas das outras histonas, o N terminal da H3 (vermelho) representa um domínio altamente conservado que está susceptível a ser exposto ou prolongado para fora da fibra da cromatina. Várias modificações pós-traducionais distintas são conhecidas por ocorrer no N terminal da H3, incluindo acetilação (bandeira verde), fosforilação (círculo branco) e metilação (hexágono amarelo). Outras modificações são conhecidas e podem ocorrer no domínio globular.

Adaptado de Strahl e Allis, 2000.

Em mamíferos, normalmente ocorrem dois principais ciclos ou ondas de demetilações-metilações do genoma: durante o desenvolvimento das células germinativas e após a fertilização (IGUMA, 2005), e, no caso dos embriões produzidos por meio de TN, nos estágios iniciais de divisões celulares (FAIRBURN et al., 2002).

Supõe-se que a reprogramação inadequada do genoma após o procedimento de TN seja a principal razão para desenvolvimento deficiente dos clones (JAENISCH et al., 2002). As frequentes anomalias inerentes a diferentes espécies de animais clonados dão base para a argumentação de que alterações epigenéticas são responsáveis por muitas falhas no desenvolvimento (SHI et al., 2003).

Assim, a prevenção de erros epigenéticos tem sido sugerida como limitante para melhorar a taxa de sucesso da clonagem animal (WANG et al., 2011). Isto torna a disponibilidade de células cujos núcleos estejam aptos a sofrerem reprogramação epigenética um importante pré-requisito para a TN, assim como a célula doadora de núcleo constitui componente crucial no processo de clonagem (FU et al., 2008; WANI et al., 2010). Neste sentido, especula-se que o uso de células-tronco mesenquimais como doadoras de núcleo na TN culminaria em taxas de produção de embriões e gestações maiores e mais eficientes pelo fato hipotético do núcleo destas células possuir menos marcas epigenéticas e sofrer a reprogramação de uma maneira mais correta pelo citoplasma do ovócito receptor.

Tipos Celulares

Após o sucesso do processo de clonagem com células somáticas adultas (WILMUT et al., 1997), se iniciou uma especulação no sentido de que uma ampla variedade de células diferenciadas poderia ser usada na TN. No entanto, a baixa eficiência global indica que há aparentemente algumas limitações do potencial de desenvolvimento genético nas células diferenciadas (ZAKHARTHCHENCKO et al., 1999). Esse fato conduz a necessidade de se encontrar células com menor grau de diferenciação com objetivo de melhorar a eficiência da técnica.

Em mamíferos, até o ano 2002, dos mais de 200 tipos celulares distinguíveis pela morfologia, menos de 5% desses tipos celulares tinham sido testados como doadores de núcleo na TN (OBACK; WELLS, 2002). Dentre os tipos celulares já utilizados na clonagem podemos citar

células da glândula mamária, células musculares, fibroblastos de pele de orelha, células do epitélio ovidutal, células do *cumulus oophorus*, células gonadais fetais, fibroblastos fetais, fibroblastos da mucosa oral, células de Sertoli e células neurais (ZHOU et al., 2007). E ainda não se conhece quais tipos são os mais bem sucedidos na TN (KATO et al., 2000; MIYOSHI et al., 2003).

Estudos comparativos mostram diferenças significativas na capacidade de várias linhagens celulares produzirem desenvolvimento embrionário. Os núcleos das células que são relativamente menos diferenciadas suportam melhor o completo desenvolvimento, comparados com aquelas células que estão totalmente diferenciadas (HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2002).

Sabe-se que a clonagem usando células-tronco embrionárias é significativamente mais eficiente do que quando se usa células adultas (JAENISCH et al., 2002), mas o uso de células embrionárias apresenta algumas limitações éticas e técnicas, surgindo a fonte de células fetais como alternativa para uso na clonagem.

Um exemplo de alguns tipos celulares estudados em humanos e recentemente em animais domésticos, por suas características de células-tronco mesenquimais, são as células provenientes dos anexos fetais, como células do fluido amniótico e células do cordão umbilical, além de CTM provenientes do tecido adiposo.

As células provenientes dos anexos fetais, como células do fluido amniótico e células do cordão umbilical, além de CTM provenientes do tecido adiposo, são exemplo de alguns tipos celulares estudados em humanos e recentemente em animais domésticos, por suas características de células-tronco mesenquimais.

Dessa forma, o estabelecimento de linhagens de células-tronco multipotentes provenientes de tecido adulto nas espécies domésticas poderia ter um grande impacto na pecuária, assim como no campo da biomedicina (Dev et al., 2012).

Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais – CTM (*mesenchymal stem cell*, MSC), também chamadas de células progenitoras mesenquimais (KARAHUSEYINOGLU et al., 2007), representam um arquétipo das células-tronco somáticas multipotentes. As CTM são uma promessa para aplicação na medicina regenerativa em humanos (WAGNER et al., 2005) e também em animais domésticos (CREMONESI et al., 2011), principalmente devido a sua capacidade intrínseca de autorregeneração e diferenciação em vários tipos celulares funcionais (BAKSH et al., 2004).

Os critérios mínimos para se definir as CTM são sua característica plástica aderente quando mantidas sob condições de cultivo; apresentar padrões de expressão de antígenos de superfície incluindo CD29, CD44 (WAGNER et al., 2005), CD73, CD90 e CD105 (DE MATTOS CARVALHO et al., 2009); e não apresentar expressão dos marcadores da linhagem hematopoiética e HLA-DR (WAGNER et al., 2005). Ainda devem ter capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (PITTENGER et al., 1999).

As CTM são células com alto potencial de expansão *in vitro* e capacidade autorregenerativa, que foram primeiramente isoladas da medula óssea (PROCKOP, 1997; PITTENGER et al., 1999; BAKSH et al., 2004). Entretanto, as CTM que residem dentro do microambiente da medula óssea são células-tronco multipotentes adultas (ALVIANO et al., 2007) e têm o número celular, capacidades de proliferação e de diferenciação que diminuem com a idade do doador e as passagens do cultivo *in vitro*. Portanto, tem-se como resultado a senescência celular, pela qual as células multipotentes poderiam se replicar um limitado número de vezes antes de sofrer apoptose (D'IPPOLITO et al., 1999).

Como a medula óssea, o tecido adiposo é derivado do mesoderma e contém no estroma uma população de células endoteliais vasculares, músculo liso e células-tronco (ZUK et al., 2001). Células-tronco são

raras no tecido adulto e de difícil isolamento e manutenção *ex vivo*. A utilização do tecido adiposo como fonte de células-tronco vem sendo muito estudada em humanos, pois se trata de uma fonte pós-natal abundante e acessível de células para as terapias regenerativas. Em humanos, a gordura subcutânea pode ser coletada seguindo procedimentos minimamente invasivos (VALLÉE et al., 2009) que permitem a extração de grande volume de tecido com limitada morbidade (RODRIGUEZ et al., 2005).

A demonstração de que as células derivadas do tecido adiposo têm capacidade de participar na regeneração tecidual após transplante em modelos animais (RODRIGUEZ et al., 2004) e o potencial para produção de uma ampla variedade de substitutos autólogos para a engenharia de tecidos (VALLÉE et al., 2009) realçam o conceito de que o tecido adiposo é uma nova fonte de células-tronco.

Além de todas as vantagens citadas, as CTM derivadas do tecido adiposo humano são capazes de resistir aos procedimentos de congelação e descongelação sem perda das propriedades de multipotencialidade (RODRIGUEZ et al., 2004). A junção das características de coleta, grande quantidade e multipotencialidade fazem com que elas se tornem fonte de células atrativas para o procedimento de TN em animais domésticos.

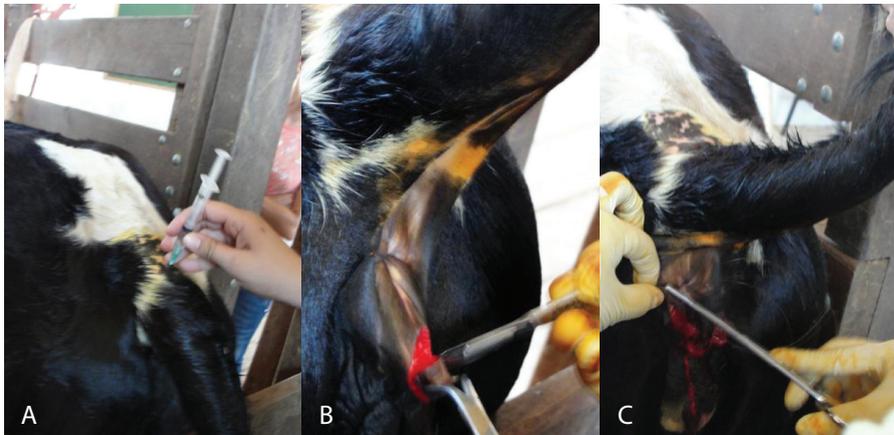
Nascimento de Bovino Saudável Proveniente de Clonagem com Células-tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo

A obtenção de produtos nascidos vivos e saudáveis com certeza é o maior objetivo da transferência nuclear. Mas esse objetivo tem sido alcançado com uma eficiência ainda muito baixa. Muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo têm testado diversos tipos celulares no intuito de melhorar tanto as taxas de produção de embriões quanto as taxas de gestações e nascimentos de animais saudáveis.

Nesse sentido, e de maneira inovadora, foi possível estabelecer uma linhagem de células-tronco mesenquimais a partir do tecido adiposo de um bovino da raça Guzerá Leiteiro e utilizar essas células para produzir um clone bovino saudável por meio da transferência nuclear.

Isolamento das células do tecido adiposo

Neste trabalho, para a obtenção da célula doadora de núcleo, foi realizada a coleta do tecido adiposo de uma fêmea doadora da raça Guzerá, aos 7 meses de idade. Para a coleta, a região perineal da fêmea foi tricotomizada, higienizada e a antissepsia foi realizada com álcool iodado. Em seguida, o animal foi submetido à anestesia epidural com lidocaína 2%, na dose de 1 mL para 100 kg de peso do animal. A biópsia coletada foi imediatamente imersa em solução tampão phosphate-buffered saline (PBS) aquecida à 37 °C. O local da biópsia foi suturado com pontos simples isolados (Figura 3).



Fotos: Carolina Gonzales da Silva

Figura 3. Procedimento de coleta de tecido adiposo em bovino com sete meses de idade, na região perineal. (A) realização da anestesia epidural com lidocaína 2%; (B) retirada da biópsia de pele e tecido adiposo; (C) sutura do local da coleta da biópsia com pontos simples solados.

A biópsia coletada foi levada imediatamente ao laboratório, onde foi cultivada por meio de explante. Para isso, fragmentos de aproximadamente 1 mm³ foram seccionados a partir da biópsia e

depositados no fundo da placa de Petri para que as células migrassem do tecido para o plástico da placa.

Após alguns minutos para o estabelecimento do contato tecido-placa de petri, foi adicionado meio Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino para cobrir as biópsias (Figura 4).

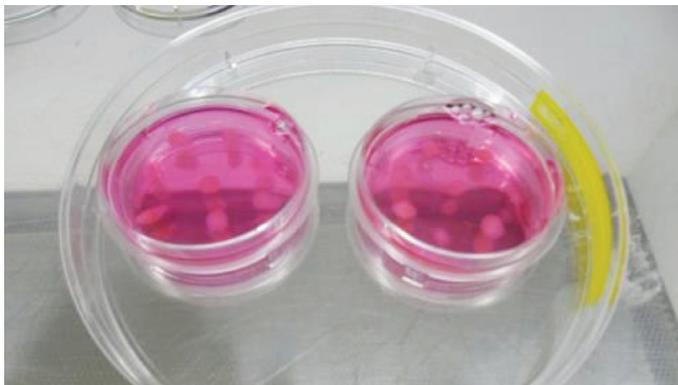


Foto: Carolina Gonzales da Silva

Figura 4. Placas de Petri com fragmentos do tecido adiposo cobertos com meio de cultivo que foram posteriormente levadas para incubadora para a proliferação celular.

As placas foram transferidas cuidadosamente para incubadora estabilizada a 38,5 °C, contendo 5% de CO₂ e umidade elevada. Após o cultivo por sete dias, as biópsias foram retiradas, o meio trocado. As células isoladas foram cultivadas por mais 7 dias nas mesmas condições. Após esse período, as células isoladas foram ressuspensas pela ação de tripsina e depositadas em garrafas de cultivo para aumentar seu número e atingirem a fase de 100% de confluência celular. Ao atingirem esse estado, as células foram criopreservadas em solução de DMSO 10% em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos.

As células permaneceram criopreservadas e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das avaliações para caracterização como CTM ou utilização na Transferência Nuclear.

Caracterização das células-tronco mesenquimais

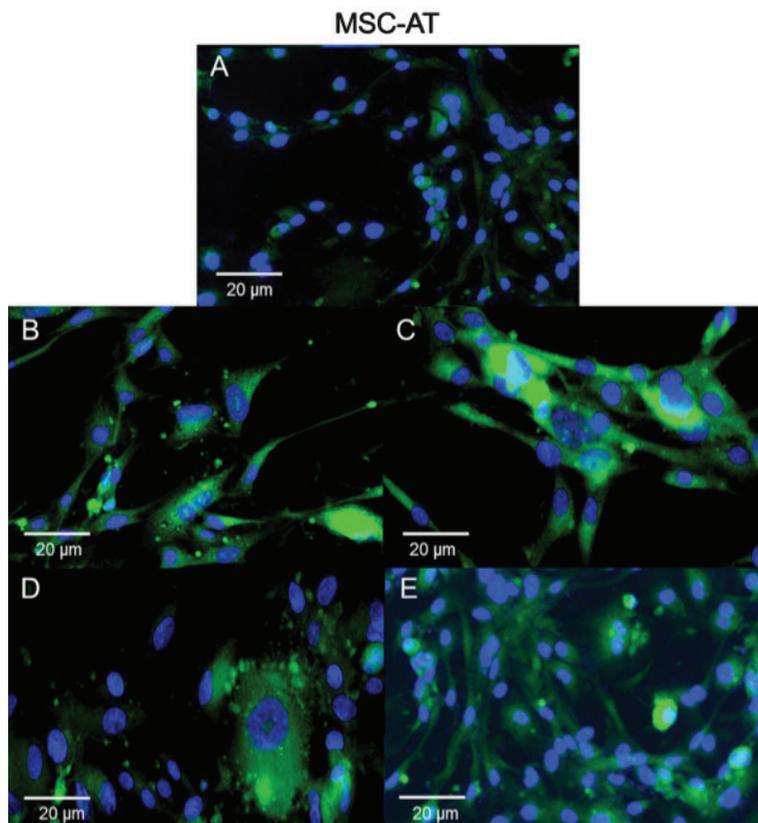
A caracterização das células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo foi realizada com auxílio de imunomarcagem, citometria de fluxo e RT-PCR. Além disso, foi realizada também a diferenciação das células em três linhagens celulares: adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Imunocitoquímica

As células cultivadas foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) *overnight*. Foram lavadas três vezes e incubadas com os anticorpos secundários anticamundongo com o corante FITC a uma diluição de 1:100. Para a coloração do núcleo, foi utilizado o DAPI. As imagens (Figura 5) foram coletadas sob uma luz Axiolmager A.1 e um microscópio de luz ultravioleta conectado a AxioCam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e processadas utilizando o software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss).

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários usados para citometria de fluxo e imunocitoquímica.

Anticorpo		Diluição		Espécie	Fabricante
		FC	IC		
CD34	Precursor de células hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais	1:50	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich
CD45	Anticélulas linfoides da medula óssea	1:50	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich
CD44	Receptor celular para ácido hialurônico reativa com células nucleadas da medula óssea	1:30	1:50	Camundongo	Sigma-Aldrich
CD90	Antígeno antitimócitos 1	1:30	1:50	Camundongo	Sigma-Aldrich
CD105	Antiendoglina	1:50	1:25	Camundongo	Sigma-Aldrich
CD29	Anti-integrina $\beta 1$	1:50	1:25	Camundongo	Sigma-Aldrich
CD73	Antinucleotidase	1:25	1:25	Camundongo	Sigma-Aldrich



Fotos: Tereza Cristina Cardoso

Figura 5. Micrografias da análise de imunocitoquímica realizada com as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo bovino demonstrando que as células não apresentaram os marcadores de superfície CD 34 e CD 45 (A), os marcadores CD 29 (B), CD 73 (C), CD 90 (D) e CD 105 (E) estavam presentes.

Citometria de fluxo

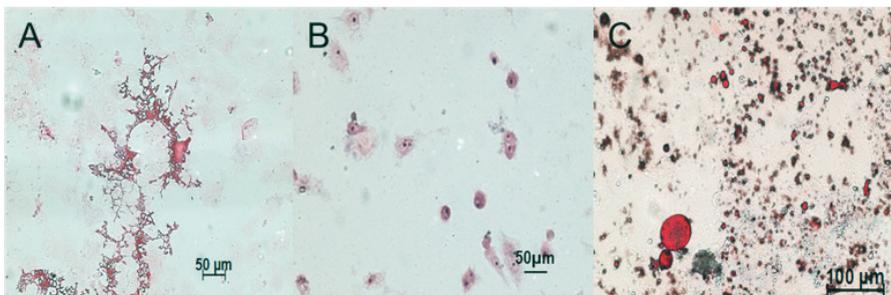
As células foram tripsinizadas para descolamento e incubadas com os mesmos anticorpos primários descritos para a imunocitoquímica (Tabela 1). Após a incubação as células foram lavadas e colocadas com os anticorpos secundários por 30 minutos na diluição de 1:50. Foram lavadas e fixadas com paraformaldeído. Os dados foram adquiridos com o citômetro Attune™ Acoustic Focusing. O padrão negativo foi examinado aplicando a mesma suspensão de células com a primeira

incubação, e o resultado foi incluído na compensação global para excluir autofluorescência. O filtro BL1-A (488 nm) foi usado em todas as análises.

Diferenciação em três linhagens celulares

Para diferenciação nas diferentes linhagens celulares, as células foram cultivadas nas mesmas condições já descritas. A diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (StemPro Differentiation Medium, Invitrogen). O meio DMEM foi substituído pelo meio de diferenciação osteogênica e foi trocado a cada 4 dias. Após 20 dias de diferenciação, as células foram fixadas com paraformaldeído e a mineralização pelo cálcio foi acessada por meio da coloração por Alizarin Red. Nesse procedimento, a atividade de fosfatase alcalina foi mensurada pela reação com o substrato p-nitrofenil fosfatase (p-NPP). Já para diferenciação adipogênica, foi utilizado um meio específico, o qual foi trocado a cada 24 horas durante 15 dias de diferenciação celular. Em seguida, as células foram fixadas e coradas com a solução de Oil Red para verificar a presença de acúmulo intracelular de vacúolos ricos em lipídeos e assim confirmar a diferenciação adipogênica. A indução condrogênica foi realizada com meio de diferenciação suplementado com o indutor condrogênico. As células foram mantidas nessas condições por uma semana, trocando o meio a cada 24 horas. Depois de serem fixadas as células foram coradas com Safranina O para identificação dos glicosaminoglicanos.

Na Figura 6, comprova-se o potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. As células coradas com Alizarin Red demonstram calcificação da matriz celular (Figura 6A), indicando diferenciação osteogênica. Para diferenciação condrogênica, após a coloração com Safranin O, a presença de glicosaminoglicanos foi observada como depósitos vermelhos nas células (Figura 6B). A diferenciação adipogênica foi mostrada por vacúolos de lipídeos dentro das células coradas usando Oil Red (Figura 6C).



Fotos: Tereza Cristina Cardoso

Figura 6. Caracterização fenotípica de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo bovino. (A) diferenciação em osteócitos com depósitos de cálcio foi confirmada pela coloração com Alizarin; (B) diferenciação em condrócitos confirmada pela coloração de Safranin O, revelando glicosaminoglicanos; (C) diferenciação em adipócitos confirmada pela coloração com Oil red, destacando os depósitos de lipídeos em vermelho.

Transferência nuclear com as células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo

Para a obtenção dos citoplasmas receptores, ovários foram coletados em abatedouro próximo ao Centro de Tecnologias em Raças Zebuínas Leiteiras (CTZL) da Embrapa Cerrados e deles foram extraídos os ovócitos que maturaram por 18 horas em incubadora a 38,5 °C e 5% CO₂. Após a maturação *in vitro*, foram retiradas as células *cumulus oophorus* dos ovócitos e procedeu-se a seleção dos maturados, que apresentavam o primeiro corpúsculo polar evidente. Com auxílio do micromanipulador (IM-9B, Narishige, NY, USA), aspirou-se o núcleo dos ovócitos e em cada um dos ovócitos enucleados foi inserida uma célula tronco mesenquimal do tecido adiposo, previamente preparada. Para que houvesse a fusão da célula doadora de núcleo inserida ao citoplasma do ovócito receptor, procedeu-se o estímulo elétrico.

Para simular os eventos que ocorrem com a entrada do espermatozoide no ovócito e continuar o desenvolvimento embrionário, realizou-se a ativação química com ionomicina e 6-DMAP. Após o período da ativação, os embriões foram transferidos para o meio de cultivo, onde permaneceram por até 8 dias, quando foi realizada a transferência para o útero de receptoras síncronas naturalmente.

Foram produzidos 16 embriões em quatro procedimentos de transferência nuclear. Desses, foram transferidos quatro e obteve-se uma gestação. Toda a gestação do animal foi normal e durou 291 dias. O parto também foi normal e a bezerra nasceu saudável com 35 kg, o mesmo peso que a doadora das células nasceu. A bezerra foi chamada de Brasília da Cerrados (Figuras 7 e 8), pois nasceu na semana da comemoração do aniversário da referida cidade.



Fotos: Carolina Gonzales da Silva

Figura 7. Brasília da Cerrados (A), bezerra clonada por transferência de núcleos, utilizando célula tronco mesenquimal do tecido adiposo da doadora Acácia da Cerrados (B).



Foto: Tatiana Miranda Mattos Martins

Figura 8. Equipe do Centro de Tecnologias de Raças Zebuínas Leiteiras da Embrapa Cerrados com a Bezerra Brasília da Cerrados.

O nascimento de Brasília comprovou a viabilidade/exequibilidade da utilização de uma célula tronco mesenquimal na transferência nuclear. Brasília nasceu saudável e não apresentou nenhuma doença ou defeito congênito muito comum em clones bovinos, como síndrome do bezerro gigante ou cordão umbilical espessado.

Considerações Finais

Este trabalho demonstrou que o tecido adiposo é uma fonte promissora de células-tronco mesenquimais (CTM) e pode ser utilizado na transferência de núcleos (TN), uma vez que uma bezerra saudável foi gerada. A crescente utilização tanto da clonagem bovina comercial quanto da pesquisa requer esforços para melhoria da técnica e avanços nos estudos com CTM do tecido adiposo é uma importante estratégia para aumentar a eficiência da TN em bovinos.

Referências

- ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; MARCHIONNI, C.; ARPINATI, M.; BONSI, L., FRANCHINA, M., LANZONI, G.; CANTONI, S.; CAVALLINI, C.; BIANCHI, F.; TAZZARI, P. L.; PASQUINELLI, G.; FORONI, L.; VENTURA, C.; GROSSI, A.; BAGNARA, G. P. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 1-14, 2007.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, p. 301-316, 2004.
- CAMPBELL, K. H. S. Nuclear transfer in farm animal species. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 10, p. 245-252, 1999.
- CAMPBELL, K. H. S.; FISHER, P.; CHEN, W. C.; CHOI, I.; KELLY, R. D. W.; LEE, J.-H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68S, p. S214-S231, 2007.
- CAMPBELL, K. H. S.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 933-942, 1993.

CHENG, W. T. K.; LIU, B. T.; SU, H. Y.; LEE, J. W.; WANG, C. H.; LEE, S. N.; CHU, F. H.; YANG, D. W.; CHEN, L. R.; SHEN, P. C. Enucleation after fusion and activation enhances the development of reconstructed bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 29, p. 162-170, 2011.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; CONSIGLIO, A. L. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, p. 1400-1415, 2011.

D'IPPOLITO, G.; SCHILLER, P. C.; RICORDI, C.; ROOS, B. A.; HOWARD, G. A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, p. 1115-1122, 1999.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 303-306, 2009.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVICM, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **PNAS**, v. 98, p. 13734-13738, 2001.

DEV, K.; GIRI, S. K.; KUMAR, A.; YADAV, A.; SINGH, B.; GAUTAM, S. K. Derivation, characterization and differentiation of buffalo (*Bubalus bubalis*) amniotic fluid derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 704-711, 2012.

FAIRBURN, H. R.; YOUNG, L. E.; HENDRICH, B. D. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? **Current Biology**, v. 12, p. R68-R70, 2002.

FU, J.; GUAN, P.; ZHAO, L.; LI, H.; HUANG, S.; ZENG, F.; ZENG, Y. Effects of donor cells on in vitro development of cloned bovine embryos. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, p. 273-278, 2008.

GÓMEZ, M. C.; POPE, C. E.; DRESSER, B. L. 2006. Nuclear transfer in cats and its application. **Theriogenology**, v. 66, p. 72-81, 2006.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 6-13, 2000.

HIIRAGI, T.; SOLTER, D. Reprogramming is essential in nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 417-421, 2005.

HOCHEDLINGER, L.; JAENISCH, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. **Nature**, v. 415, p. 1035-1038, 2002.

IGUMA, L. M. **Efeitos da transfecção de células doadoras de núcleos e da administração de FSH em vacas doadoras de ovócitos receptores na transferência nuclear de células somáticas**. 2005. Tese (Doutorado)- Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2005.

INOUE, K.; Ogonuki, N.; Mochida, K.; Yamamoto, Y.; Takano, K.; Kohda, T.; Ishino, F.; Ogura, A. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1394-1400, 2003.

JAENISCH, R.; EGGAN, K.; HUMPHERYS, D.; RIDEOUT, W.; HOCHEDLINGER, K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, p. 389-396, 2002.

JASENCAKOVA, Z.; SOPPE, W. J. J.; MEISTER, A.; GERNAND, D.; TURNER, B. M. SCHUBERT, I. Histone modifications in Arabidopsis – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. **The Plant Journal**, v. 33, p. 471-480, 2003.

KARAHUSEYINOGLU, S.; CINAR, O.; KILIC, E.; KARA, F.; AKAY, G. G.; DEMIRALP, D. O.; TUKUN, A.; UCKAN, D.; CAN, A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. **Stem Cells**, v. 25, p. 319-331, 2007.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 231-237, 2000.

MIYOSHI, K.; RZUCIDLO, S. J.; PRATT, S. L.; STICE, S. L. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1079-1086, 2003.

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 2-10, 2012.

NIEMANN, H.; TIAN, X. C.; KING, W. A.; LEE, R. S. F. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v. 135, p. 151-163, 2008.

OBACK, B.; WELLS, D. Practical aspects of donor cell selection for nuclear cloning. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, p. 169-174, 2002.

PICOU, A. A. **The isolation and characterization of bovine adult derived adipose stem cells for the use in nuclear transfer**. 2007. Thesis (Máster of Science Thesis) - Louisiana State University, 2009. Disponível em: <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-07142009-134947/unrestricted/APicou_Thesis.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2015.

PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

PROCKOP, D. J. Marrow stroma cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p. 71-74, 1997.

REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis**, v. 22, p. 2838-2843, 2001.

REN, Y.; WU, H.; MA, Y.; YUANM, J.; LIANGM, H.; LIU, D. 2014. Potential of adipose-derived mesenchymal stem cells and skeletal muscle-derived satellite cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in Arbas Cashmere goats. **Plos One**, v. 9, 2014.

RODRIGUEZ, A. -M.; ELABD; DELTEIL, F.; ASTIER, J.; VERNOCHE, C.; SAINT-MARC, P.; GUESNET, J.; GUEZENNEC, A.; AMRI, E. -Z.; DANI, C.; AILHAUD, G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, p. 255-263, 2004.

RODRIGUEZ, A.-M.; ELABD, C.; AMRI, E. -Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, v. 87, p. 125-128, 2005.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 129-140, 2008.

SHI, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; WOLF, E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, v. 71, p. 91-113, 2003.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, p. 41-45, 2000.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 211-230, 2006.

VALLÉE, M.; CÔTÉ, J. -F.; FRADETTE, J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. **Pathologie Biologie**, v. 57, p. 309-317, 2009.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEINA, V.; ANSORGEC, W.; HO, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1402-1416, 2005.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, p. 369-374, 1998.

WANG, Y. S.; XIONG, X. R.; AN, Z. X.; WANG, L. J.; LIU, J.; QUAN, F. S.; HUA, S.; ZHANG, T. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 75, p. 819-825, 2011.

WANI, N. A.; WERNERY, U.; HASSAN, F. A. H.; WERNERY, R.; SKIDMORE, J. A. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 373-379, 2010.

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

WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V.; BREM, G. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 99-110, 1998.

ZAKHARTCHENKO, V.; DURCOVA-HILLS, G.; SCHERNTHANER, W.; STOJKOVIC, M.; REICHENBACH, H. D.; MUELLER, S.; STEINBORN, R.; MUELLER, M.; WENIGERKIND, H.; PRELLE, K.; WOLF, E.; BREM, G. Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, p. 421-426, 1999.

ZHENG, Y. M.; ZHAO, H. Y.; ZHAO, X. E.; QUAN, F. S.; HUA, S.; HE, X. Y.; LIU, J.; HE, X. N.; LIN, H. Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived stem cells transfected with enhanced green fluorescence protein gene. **Reproduction**, v. 137, p. 793-801, 2009.

ZHOU, H.; LIU, C.; WANG, W. Heterospecific nuclear-transferred embryos derived from equine fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 243-247, 2007.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 211-228, 2001.

Brasilia from Cerrados: first bovine cloned using mesenchymal stem cells from adipose tissue

Abstract

The calf called Brasília of the Cerrados was the first bovine cloned using mesenchymal stem cells from the adipose tissue of a Guzerat cow. Because of the importance of this event this paper aimed to describe the methodology and present the innovative results of the Embrapa Cerrados with the use of mesenchymal stem cells from adipose tissue, on the production of embryos, pregnancies and birth of a healthy animal by nuclear transfer technique.

Index terms: Bovine, multipotent cells, nuclear transfer, reprogramming.

Embrapa

Cerrados

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE: 13138