



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ISOLAMENTO, CRIOPRESERVAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DO CORDÃO
UMBILICAL, CÉLULAS DO TECIDO ADIPOSEO E CÉLULAS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR (CLONAGEM)**

CAROLINA GONZALES DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA-DF

2013



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ISOLAMENTO, CRIOPRESERVAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DO CORDÃO
UMBILICAL, CÉLULAS DO TECIDO ADIPOSEO E CÉLULAS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR (CLONAGEM)**

Carolina Gonzales da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Nair Bão

BRASÍLIA-DF, 2013

“Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,

Um dia a gente chega, no outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua história

Cada ser em si carrega o dom de ser capaz

E ser feliz.”

(Renato Teixeira)

**Aos meus queridos pais, Entrigenia e José, que me apóiam em minhas decisões e que
me amam incondicionalmente,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e acima de tudo a Deus, que com sua infinita bondade, coloca pessoas e oportunidades maravilhosas no meu caminho, e me abençoa com saúde para que eu possa amar e ser amada por essas pessoas e trilhar minha vida por entre essas oportunidades.

À minha família, meu pai, José da Silva, minha mãe, Entrigenia Gonzales e minha irmã, Camila Gonzales da Silva, que mesmo na distância, são minha inspiração para continuar, pois quero ser motivo de orgulho para vocês.

À minha orientadora Sônia Nair Bão, por acreditar na minha competência e aceitar me orientar nesse projeto de mestrado, pelas correções, cobranças e exemplo de responsabilidade.

Ao meu co-orientador Carlos Frederico Martins, por, desde o início, acreditar no meu potencial e me incumbir de muitas tarefas e responsabilidades, e me ajudar a realizar esse sonho, fazendo-me acreditar que sou capaz e que posso muito mais.

Aos membros dessa banca, Sharon Lisauskas e Maurício Machaim, por aceitarem participar desse momento tão importante para mim.

Às minhas queridas “cowpanheiras” Andrielle Mendes, Elisa Ribeiro da Cunha e Heidi Christina Bessler, por tanta, tanta, mas tanta coisa juntas, dentro e fora do laboratório. Foram tantas risadas, momentos de loucura, companheirismo, ajuda nas tarefas, bolos de aniversário, lágrimas derramadas, que não consigo imaginar minha vida aqui em Brasília sem vocês. Amo vocês!

Às minhas eternas e queridas “Pink Ladies”, Karol, Jaque, Léo, Quinha, Ju e Paty, por serem meu porto seguro, mesmo distante, por sempre me entenderem com

palavras ou simplesmente com um olhar, por serem a melhor parte de mim... Dizer que as amo, vocês sabem, é muito pouco...

Ao meu namorado Mateus Figueiredo Santos, por me dar forças nos piores momentos, me escutar, me acalmar e me incentivar a seguir em diante, por tornar a minha vida mais doce e alegre.

A todos os meus amigos e primos de Campo Grande e de Brasília, meus tesouros! Em especial às minhas queridas Bia Bertozzo, Letícia Umeda e Roberta Izzo e ao meu querido primo Nilson Gonzalez.

A todos que torceram pelo sucesso desse trabalho, e que contribuíram para sua execução, Professor Ivo Pivato e George Henrique Lima Martins pelas inovulações, funcionários da Embrapa Cerrados, em especial ao Cléber Pio, sempre pronto a me ajudar dentro e fora do trabalho, equipe da limpeza, que sempre manteve um ambiente propício ao desenvolvimento de nossos trabalhos.

À Embrapa Cerrados, CTZL, Universidade de Brasília, CAPES, FAPDF, FINEP e CNPq por fornecerem estrutura física e material para a realização do projeto e pela bolsa do mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por colaborar na minha formação profissional, e às secretárias Danielle e Ana Paula, sempre dispostas a ajudar e esclarecer dúvidas.

Enfim, a todos que cruzaram meu caminho e que me ajudaram a tornar-me o que sou hoje, possibilitando a conquista de mais essa vitória.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Transferência Nuclear (TN)	3
2.2. Aplicações da TN	4
2.3. Baixa eficiência na TN	7
2.4. Reprogramação epigenética na TN	9
2.5. Linhagens celulares	12
2.5.1. Células-tronco mesenquimais	14
2.5.2. Células-tronco multipotentes derivadas do tecido adiposo (<i>Multipotent Adipose-Derived Stem Cells, MADS</i>)	18
3. HIPÓTESES	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivos gerais	21
4.2. Objetivos específicos	21
5. MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1. Local	22
5.2. Delineamento experimental	22
5.3. Análise estatística	24
5.4. Obtenção de células do fluido amniótico (CFA) de úteros gravídicos de abatedouro	24
5.5. Determinação do melhor meio para cultivo de células amnióticas	25

5.6. Criopreservação de células amnióticas e determinação da melhor solução crioprotetora	26
5.7. Isolamento <i>in vivo</i> e cultivo <i>in vitro</i> dos diferentes tipos celulares	27
5.7.1. Isolamento das células do fluido amniótico (CFA)	28
5.7.2. Isolamento das células da geleia de Wharton do cordão umbilical (CGW)	31
5.7.3. Isolamento das células do tecido adiposo (CTA)	33
5.8. Criopreservação dos diferentes tipos celulares	34
5.9. Avaliação da viabilidade celular pós-criopreservação	35
5.9.1. Avaliação de integridade de membrana	35
5.9.2. Avaliação de integridade de DNA	35
5.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos tipos celulares	36
5.11. Transferência nuclear	37
5.11.1. Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos	37
5.11.2. Transferência nuclear com os três tipos celulares	38
5.12. Transferência dos embriões e monitoramento da gestação	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Determinação do melhor meio de cultivo para as células amnióticas coletadas de úteros de vacas de abatedouro	41
6.2. Determinação da melhor solução crioprotetora para as células amnióticas coletadas de úteros de vacas de abatedouro	42
6.3. Isolamento <i>in vivo</i> e cultivo <i>in vitro</i> dos diferentes tipos celulares	43
6.4. Avaliação de integridade de DNA	44
6.5. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura	45

6.6. Produção de embriões por meio de Transferência Nuclear	47
6.7. Gestações e nascimento de embriões produzidos por TN	51
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIACOES

BSA – albumina sérica bovina

CCO – complexos cumulus-ovócitos

CFA – células do fluido amniótico

CGW – células da geleia de Wharton

CTA – células do tecido adiposo

CTZL - Centro de Transferência de Tecnologias em Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira

DMEM – Dubelcco’s Modified Eagle Medium

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

EFSA - European Food Safety Authority

FDA – Food and Drug Administration

LAV – meio de lavagem

MADS – células-tronco multipotentes derivadas do tecido adiposo

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MIV – meio de maturação

MSC – células-tronco mesenquimais

PBS - *phosphate-buffered saline*

SFB – soro fetal bovino

TN – Transferência Nuclear

UV - ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da primeira fase do projeto. Isolamento, cultivo e criopreservação de células do fluido amniótico (CFA) provenientes de úteros de abatedouros em diferentes meios e soluções crioprotetoras 23
- Figura 2.** A) Dissecção das camadas uterinas. Observar os placentomas (setas); B) Aspiração do fluido amniótico para isolamento das células amnióticas 25
- Figura 3.** Etapas da utilização das células isoladas *in vivo*. CFA: células do fluido amniótico; CGW: células da geleia de Wharton; CTA: células do tecido adiposo; MEV: microscopia eletrônica de varredura 28
- Figura 4:** A) Sistema utilizado para aspiração *in vivo* de líquido amniótico; B) Imagem ultrassonográfica demonstrando o correto posicionamento do feto no momento da coleta do líquido amniótico, as três linhas tracejadas apontam a orientação da saída da agulha 30
- Figura 5:** A) Fragmento do cordão umbilical coletado no momento do parto de bezerros bovinos; B) Fragmento da geleia de Wharton (esquerda) e fragmento do vaso do cordão umbilical (direita), ambas as estruturas foram cultivadas para isolamento celular 32
- Figura 6:** Placas com fragmentos do cordão umbilical cobertos com DMEM que foram posteriormente levadas para estufa para a proliferação celular 33
- Figura 7:** Fêmea Guzerá Leiteira que atualmente possui células amnióticas, da geleia de Wharton e adiposas conservadas em botijão criogênico. A) animal logo após o nascimento, quando se procedeu a coleta do cordão umbilical; B) o mesmo animal

com sete meses de idade, no momento da coleta do tecido adiposo; C) o mesmo animal com 20 meses de idade 33

Figura 8: Procedimento de coleta de biópsia de tecido adiposo em bovino com sete meses de idade, na região perineal 34

Figura 9. Viabilidade das células amnióticas após a criopreservação nas diferentes moléculas crioprotetoras em meio Amniomax Complete II. Nas colunas, letras diferentes representam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$) 42

Figura 10: Aspectos morfológicos dos três tipos celulares em oitava passagem. A) Células adiposas; B) Células amnióticas; C) Células da geleia de Wharton. Aumento de 400 x 44

Figura 11. Avaliação de integridade de DNA pelo método TUNEL. A) célula sob microscopia de campo claro; B) célula sob incidência de luz UV demonstrando núcleo fluorescente; C) microscopia de campo claro e luz UV, onde pode-se observar a célula inteira e o núcleo corado em azul 44

Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura de células do tecido adiposo (A, D, G), do fluido amniótico (B,E,H) e da geleia de Wharton (C,F,I). Em A, B e C) os diferentes tipos celulares em processo de aderência à placa de cultivo, quando sua fase está em transição de uma célula em suspensão, com forma arredondada, para uma célula aderida. Em D, E e F) a morfologia diferenciada do cultivo de cada tipo de célula. Células do tecido adiposo apresentaram morfologia fusiforme (D), já células amnióticas e da geleia de Wharton não apresentaram forma definida sob cultivo. Em G) uma célula do tecido adiposo com inúmeras projeções citoplasmáticas. Em H) uma célula do fluido amniótico ao centro com núcleo aparente. Em I) superfície de célula da geleia de Wharton 46

Figura 13. Gestação dupla obtida da transferência de dois embriões provenientes de TN com células da geleia de Wharton	53
Figura 14. Vista cranial (A) e caudal (B) de receptora com 270 dias de gestação de um animal clonado, apresentando hidropsia das membranas fetais	54
Figura 15. Animal clonado a partir de células do fluido amniótico. As setas indicam uma deformidade física do animal, a flexão das articulações metacarpofalangeanas	55
Figura 16. Presença de líquido de aspecto seroso dentro da cavidade torácica de bezerra clonada recém-nascida, caracterizando um hidrotórax seroso	56
Figura 17. A) Extravasamento de líquido do interior do pulmão ao corte (seta). B) Secreção espumosa no interior da traquéia de bezerra clonada (seta), indicativo de edema pulmonar	57
Figura 18. Fígado retirado de animal clonado, com coloração anormal, bordos arredondados, indicando edema do órgão e deposição de gordura na superfície (seta).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inseminações artificiais e estabelecimento de prenhez para a obtenção das células do fluido amniótico	29
Tabela 2. Cultivo de células do fluido amniótico em meio DMEM e Amniomax Complete II	41
Tabela 3. Quantidade de estruturas manipuladas em cada tipo celular e controle para produção de embriões bovinos clonados	48
Tabela 4. Comparação do desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões bovinos clonados com os diferentes tipos celulares	50
Tabela 5. Resultados das prenhez, abortos e nascimentos dos três tipos celulares distintos utilizados na TN	52

RESUMO

A clonagem por transferência nuclear (TN) ainda é uma técnica com baixa eficiência em bovinos. Um dos fatores que deve ser melhorado é a fonte de células doadoras de núcleo. Quanto menos diferenciadas forem estas células, mais facilmente elas serão reprogramadas pelo citoplasma receptor, a fim de originarem embriões e bezerras a termo de uma forma saudável. Células do fluido amniótico (CFA), da geleia de Wharton do cordão umbilical (CGW) e do tecido adiposo (CTA) são fontes de células multipotentes com potencial para uma melhor reprogramação e que ainda não haviam sido testadas para a produção de embriões bovinos por meio de TN. O objetivo deste trabalho foi isolar, cultivar, criopreservar e utilizar no procedimento de TN as CFA, CGW e CTA de bovinos. Primeiramente, foram isoladas CFA de úteros de abatedouro para testar o melhor meio de cultivo (DMEM vs Amniomax Complete II), e o melhor agente crioprotetor (glicerol vs DMSO vs DMF) quanto a preservação de viabilidade celular avaliada por azul de Trypan 0,4%. Posteriormente, testou-se a possibilidade de isolamento *in vivo* dos tipos celulares. O cultivo foi feito por centrifugação das CFA e explante das CGW e CTA. Para comparação morfológica foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das células em cultivo. Para avaliação de integridade de DNA realizou-se a metodologia de TUNEL. Para a análise estatística foi realizada ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$). O meio Amniomax Complete II apresentou crescimento e confluência das CFA em todos os materiais isolados de quatro animais. O DMSO e o glicerol preservaram uma maior porcentagem de células ($84,50 \pm 9,53\%$ e $63,00 \pm 18,18\%$, respectivamente), e foram superiores ao meio com DMF ($42,00 \pm 13,92\%$). Obteve-se êxito no isolamento *in vivo* dos tipos celulares, por meio de aspiração intravaginal guiada por ultrassom no caso das CFA, coleta do cordão umbilical no momento do parto para as CGW e coleta de biópsia de animal jovem para as CTA. A avaliação de TUNEL revelou 100% de células com DNA íntegro para os três tipos celulares em primeira passagem. As micrografias em MEV revelaram CTA em padrão fusiforme de crescimento e CFA e CGW sem forma definida sob cultivo. Houve diferença significativa nas taxas de eletrofução, com resultados superiores para CFA e CGW ($85,89 \pm 9,93\%$ e $69,64 \pm 11,72\%$, respectivamente), em relação às CTA ($50,07 \pm 10,64\%$). A produção embrionária não diferiu estatisticamente entre os três tipos celulares ($46,47 \pm 7,92\%$, $45,46 \pm 13,03\%$ e $62,67 \pm 15,15\%$, para CTA, CFA e CGW, respectivamente), entretanto observou-se uma superioridade de aproximadamente 17% na produção de blastocistos para CGW em relação a CTA e CFA. Foram obtidas gestações de todos os tipos celulares, mas somente uma gestação veio a termo, proveniente de TN com CFA, e uma gestação encontra-se aos 200 dias, proveniente de CTA. O animal nascido por secção cesariana veio a óbito logo após o parto por insuficiência respiratória. Demonstrou-se ser possível isolar, cultivar e criopreservar CFA, CGW e CTA de bovinos vivos sem prejudicá-los e produzir embriões por meio de TN com eficiência utilizando esses tipos celulares.

Palavras-chave: bovino, célula-tronco, transferência nuclear

ABSTRACT

Cloning by nuclear transfer (NT) is still a technique with low efficiency in cattle. One of the factors that should be improved is the source of nucleus donor cells. The less differentiated are the cells, the easier is to reprogram their nuclei by cytoplasm receiver in order to originate healthy embryos and calves. Cells from amniotic fluid (CAF), Wharton's jelly of the umbilical cord (CWJ) and adipose tissue (CAT) are sources of multipotent cells with potential for improve reprogramming and that had not been tested for the production of bovine embryos by NT. The aim of this study was to isolate, cultivate, cryopreserve and utilize in the NT procedure, the CAF, CWJ and CAT of bovine. Firstly, CAF of uteri obtained from slaughterhouse were isolated to test what is the best medium for *in vitro* culture (DMEM vs Amniomax Complete II), and the best cryoprotectant agent (glycerol vs DMSO vs DMF), as the preservation of the cell viability assessed by Trypan Blue 0,4%. Subsequently, the possibility of isolating *in vivo* the described cell types was tested. The culture was done by centrifugation of CAF and explantation of CWJ and CAT. For morphological comparison, scanning electron microscopy (SEM) of the cells in culture was performed. For evaluating DNA integrity, the TUNEL method was carried out. For the statistical analysis was performed ANOVA followed by Tukey test ($p < 0,05$). The medium Amniomax Complete II presented growth and confluence of the CAF in all material isolated from four animals. The DMSO and glycerol preserved a higher percentage of cells ($84.50 \pm 9.53\%$ and $63.00 \pm 18.18\%$, respectively), and were superior to medium with DMF ($42.00 \pm 13.92\%$). Success was obtained in the isolation of cell types *in vivo* through use intravaginal ultrasound-guided aspiration for CAF, collection from the umbilical cord at birth for CWJ and by collecting biopsy from young animal for CAT. The evaluation of TUNEL revealed 100% of cells with intact DNA for the three cell types in the first passage. The SEM micrographs revealed a fusiform growth of CAT, and CAF and CGW without defined form under culture. There were significant differences in the rates of electrofusion, with results superior for CAF and CWJ ($85.89 \pm 9.93\%$ and $69.64 \pm 11.72\%$, respectively), relative to CAT ($50.07 \pm 10.64\%$). The embryo production did not differ significantly among the three cell types ($46.47 \pm 7.92\%$, $45.46 \pm 13.03\%$ and $62.67 \pm 15.15\%$ for CAT, CAF and CWJ, respectively), however a superiority of 17% in blastocyst production of CWJ in relation to the CAT and CAF was observed. Pregnancies were obtained for all cell types, but only one pregnancy has come to term, from TN with CAF and one gestation is on day 200 from the CAT. The born calf died soon after birth by cesarean section, due respiratory insufficiency. This study proved it is possible to isolate, cultivate and cryopreserve CAF, CAT and CWJ from live animals without harming them and to produce bovine embryos by TN efficiently using these cell types.

Key words: bovine, nuclear transfer, stem cell

1. INTRODUÇÃO

A transferência nuclear (TN), ou seja, a transferência de um núcleo doador para o citoplasma recipiente de um ovócito enucleado, é uma das técnicas disponíveis para a produção de animais clonados. Os nascimentos de produtos vivos e saudáveis produzidos por TN provam a viabilidade da técnica, porém sua eficiência ainda é baixa e, portanto, alvo de muitas pesquisas e estudos para o seu aperfeiçoamento.

O citoplasma recipiente possui uma capacidade desprogramadora capaz de alterar completamente a programação de células adultas e reprogramá-las a um estado indiferenciado, tornando essas células capazes de originarem todos os tecidos de um novo organismo e sustentar a vida embrionária e fetal.

As aplicações da TN vão desde gerar cópias idênticas de animais de produção de alto valor genético, ou de animais sob risco de extinção, até a produção de animais transgênicos que podem trazer inúmeros benefícios não somente no campo da pecuária, como também na indústria farmacêutica, no estudo de doenças humanas e em transplantes de órgãos.

Muitas são as causas da baixa eficiência da TN, dentre elas podemos destacar a fonte de células doadoras de núcleo. Quanto menor o grau de diferenciação de uma célula, mais potencialmente ela será desprogramada pelo citoplasma receptor. Assim, as células-tronco surgem como uma promissora fonte de núcleos a serem utilizados na TN.

As células-tronco mesenquimais (MSC) são células-tronco multipotentes com características bem definidas e capacidade intrínseca de autorregeneração e diferenciação em tipos celulares funcionais, sendo por esse motivo uma promessa para

aplicação na medicina regenerativa em humanos e animais domésticos. Exemplos dessas células são as derivadas dos anexos fetais, como células do fluido amniótico e células do cordão umbilical.

Outro tipo celular que vem sendo estudado e utilizado, principalmente pela sua facilidade de coleta e abundância, são as células-tronco multipotentes derivadas do tecido adiposo, que possuem características similares, mas não idênticas, às das MSC.

Entretanto, apesar de se apresentarem como promissoras fontes de células doadoras de núcleo para a TN, as células do fluido amniótico, do cordão umbilical e do tecido adiposo, ainda não haviam sido utilizadas para a produção de embriões bovinos clonados. Desta forma, este trabalho buscou isolar, cultivar e criopreservar cada um dos tipos celulares citados e testar sua capacidade na produção de blastocistos, gestações e produtos nascidos por TN.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. 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 das células somáticas doadoras de núcleo poderão 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 e Lucas-Hahn, 2012).

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

A competência do blastocisto produzido por transferência nuclear tem sido demonstrada pela produção de animais vivos (Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998). O sucesso da TN é um forte argumento que uma atividade desprogramadora do núcleo celular está presente no citoplasma, capaz de alterar completamente a programação das células adultas, mas a natureza desses fatores não tem sido precisamente caracterizada (Vajta e Gjerris, 2006). Wilmut e colaboradores (1997) afirmam que o fato do 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. Até o ano de 2011, a TN de células somáticas havia sido realizada com sucesso em 16 espécies (Niemann e Lucas-Hahn, 2012).

Atualmente, a TN é o modo mais eficiente para gerar animais de produção geneticamente modificados (Vajta e Gjerris, 2006), e cópias de animais de produção de alto valor genético. Porém, a produção eficiente de produtos nascidos vivos permanece como maior obstáculo para aplicações desta tecnologia (Wani et al., 2010).

2.2. Aplicações da TN

Originalmente, os animais clonados foram produzidos para gerar um grande número de animais geneticamente superiores para utilização na pecuária (Wolf et al., 1998). Mas com o passar do tempo, um intenso interesse científico no campo da TN foi gerado, principalmente na engenharia de animais transgênicos, para várias propostas biomédicas e na pecuária (Wells et al., 1999). Cada vez mais, pesquisas têm dado atenção à técnica da transgênese animal, que pode ser de grande valor em aplicações práticas (Fu et al., 2008).

A clonagem nos fornece modelos experimentais únicos para o estudo dos mecanismos fundamentais do desenvolvimento de mamíferos, tais como a reprogramação do genoma, porque gera cópias individuais dos doadores, ignorando o processo de reprodução normal (Inoue et al., 2003). Células de animais com atributos únicos tais como resistência a doenças, podem ser usadas para produzir um número maior de animais do mesmo genótipo para pesquisas ou para uso em programas de melhoramento genético (Hill et al., 2000).

Liu et al. (2010) provaram ser possível produzir embriões clonados a partir de células somáticas isoladas e cultivadas a partir de sêmen fresco de bovinos. Ainda,

obtiveram estruturas clivadas a partir de células isoladas, mas não cultivadas, de sêmen congelado, abrindo uma nova possibilidade de clonagem de animais mortos, em que o único material genético viável é o sêmen desses animais.

No ano de 2006, Vajta e Gjerris sugeriram que as duas aplicações que pareciam ser mais realistas nos próximos três a cinco anos seriam a criação de modelos animais de doenças humanas e animais biorreatores. E ainda, uma terceira aplicação e uma das mais controversas do ponto de vista social e ético, o xenotransplante.

Existem duas técnicas predominantes para a produção de animais transgênicos: a microinjeção pronuclear e a TN. Entretanto, a TN usando células transgênicas como doadoras está superando rapidamente a microinjeção pronuclear como método de escolha (Keefer, 2004).

A produção de camundongos transgênicos tornou-se uma ferramenta comum para estudo da função gênica; entretanto, a aplicação da tecnologia da transgênese em animais domésticos tem sido limitada devido o alto custo das pesquisas (Keefer, 2004).

A criação de animais que sirvam como modelo para estudo de doenças humanas, consiste na criação de um animal designado a expressar, em nível de genótipo ou fenótipo, certa doença humana. Para isso, os animais que mais se assemelham a humanos fisiologicamente e por anatomia de seus órgãos, são os suínos e ovinos (Vajta e Gjerris, 2006). Como exemplo, temos a produção de suínos transgênicos que tiveram o gene da rodopsina alterado para mimetizar uma mutação no gene humano que leva à rinite pigmentosa (Petters et al., 1997).

Os biorreatores são animais transgênicos que expressam biofármacos ou bioprodutos em suas secreções, tais como o leite. Animais transgênicos são

ferramentas úteis para a produção em massa de proteínas terapêuticas humanas (Fu et al., 2008). Além disso, a sua utilização resolve muitos dos problemas associados com biorreatores microbianos ou células animais biorreadoras (Baguisi et al., 1999). Segundo esses autores, rebanhos de cabras transgênicas de tamanho manejável poderiam facilmente produzir de 1 a 300 kg de produto purificado por ano.

Com relação aos subprodutos obtidos dos animais clonados e de sua prole, agências regulatórias ao redor do mundo, tais como a “Food and Drug Administration” (FDA) nos Estados Unidos e a “European Food Safety Authority” (EFSA), tem concordado que são seguros e não há base científica para questionar isso (Niemann e Lucas-Hahn, 2012). Porém, o preconceito contra esses subprodutos ainda se faz presente na população.

Enfim, os xenotransplantes consistem no transplante de um órgão de uma espécie que não a humana, para se reduzir o déficit de órgãos no mundo (Melo et al., 2007). O maior problema para a execução dessa técnica são as rejeições a curto e longo prazo (segundos a semanas). Assim, a utilização de animais modificados, os transgênicos, para reduzir essa rejeição aos órgãos transplantados faz da transgenia uma técnica de grande valia nesse caso. Mas o risco de ocorrência de zoonoses, ou seja, de transmissão de doenças animais para humanos fez com que essas pesquisas fossem realizadas de modo cauteloso.

Além de todas essas aplicações, tendo em vista a baixa eficiência na produção de animais transgênicos, no momento em que um animal transgênico for produzido com sucesso, a clonagem por TN servirá para criar cópias a partir desse animal, propiciando a propagação de animais transgênicos.

Outra contribuição da clonagem seria no campo da experimentação animal, por eliminar variação genética e, portanto, reduzir o número de animais experimentais requeridos (Lamberson, 1994), tornando o experimento mais homogêneo e retirando o efeito de variação individual.

Quando populações ou subpopulações estão em risco de extinção, a TN pode ser uma abordagem útil para a restauração de espécies (Gómez et al., 2006). Ainda com relação às espécies em extinção, se não estiverem disponíveis ovócitos provenientes da mesma espécie que os animais doadores do material genético, outra abordagem possível é a clonagem interespecie. Nesse caso, células doadoras de núcleo e ovócitos recipientes não pertencem à mesma espécie. Um exemplo é a clonagem utilizando células de búfalos (*Bubalus bubalis*) como doadoras, em ovócitos de vacas (*Bos indicus*) (Lu et al., 2005); ou até mesmo células de equinos transferidas em ovócitos bovinos, em que foram obtidas estruturas de até oito células, mas não havendo, ainda, a produção de blastocistos (Zhou et al., 2007). Porém, a TN não deve ser utilizada isoladamente, mas sim associada principalmente a inseminação artificial e fecundação *in vitro*, para garantir uma adequada variabilidade genética em uma população.

2.3. Baixa eficiência na TN

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

implantacional, que pode ocorrer após a transferência de blastocistos que são 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 limitadas proporções dos embriões reconstruídos conseguem se desenvolver a termo (Cheng et al., 2011).

A extensiva 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 na espécie suína, citam que muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento de embriões clonados. Esses fatores incluem 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 da célula doadora de núcleo e o *status* de diferenciação da doadora de núcleo (Campbell, 1999).

De uma forma mais geral, Miyoshi e colaboradores (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, que aumentaria 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. A segunda abordagem mencionada por Miyoshi et al. (2003) é um dos objetivos deste trabalho.

Muitos trabalhos demonstram a importância do tipo celular na eficiência da clonagem e muitos pesquisadores têm apurado que certos tipos de células doadoras mostram elevadas taxas de nascimento de prole normal após a transferência dos embriões 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 desta 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 e Lucas-Hahn, 2012). Levando isso em consideração, o uso de células embrionárias e fetais, como amnióticas e do cordão umbilical, surge como uma alternativa vantajosa.

2.4. Reprogramação epigenética na TN

Observando de uma forma mais detalhada, o sucesso da TN envolve um passo mais complexo que é a reprogramação epigenética, processo que o núcleo doador deve sofrer para se tornar totipotente (Hiragi e Solter, 2005), 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 os desenvolvimentos embrionário e fetal (Niemann e 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 foram transcritos na célula doadora original (Jaenisch et al., 2002).

Para um melhor entendimento da reprogramação epigenética, uma breve revisão será feita sobre epigenética e os seus mecanismos de regulação.

Epigenética refere-se a um conjunto de mecanismos e fenômenos que definem o fenótipo de uma célula sem afetar o seu genótipo (Sasaki e 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 este é o ponto-chave da transferência nuclear de células somáticas (Iguma, 2005).

De uma maneira mais prática para o entendimento, basta se pensar nos vários tipos celulares de um organismo multicelular superior, derivado de um ovócito fertilizado totipotente. Todos os tipos celulares têm basicamente um genótipo idêntico, no entanto, cada uma dessas células é funcionalmente e morfologicamente diferente (Shi et al., 2003).

Alguns tipos de mecanismos epigenéticos já são conhecidos, e envolvem principalmente a metilação do DNA e acetilação, metilação, fosforilação entre outras modificações que as histonas sofrem.

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 as guaninas na molécula de DNA.

A metilação do DNA desempenha também um papel importante na inativação do cromossomo X, no *imprinting*, no silenciamento de alguns genes e na ativação de

outros (Reik e Dean, 2001) e está envolvida num certo número de funções-chave no genoma (Dean et al., 2001).

A unidade fundamental da cromatina nos eucariontes é o nucleossomo, formado pelas proteínas histonas (H3, H4, H2A, H2B e H1). As extremidade N-terminais de todas as histonas, com exceção da H1, se estendem na superfície do nucleossomo e podem sofrer várias modificações, podendo assim modificar a estrutura da cromatina. Está claro que as histonas são componentes integrais e dinâmicos da maquinaria responsável pela regulação da transcrição gênica (Strahl e Allis, 2000).

As modificações mais estudadas nas histonas são a acetilação, a metilação e a fosforilação (Strahl e Allis, 2000), e essas alterações ligadas a metilação do DNA são essenciais para a correta regulação dos processos nucleares vitais tais como a transcrição, replicação, reparação e recombinação do DNA (Jasencakova et al., 2003).

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).

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).

Supõe-se que a reprogramação inadequada do núcleo após o procedimento de TN seja a principal razão para a falha no desenvolvimento dos clones (Jaenisch et al., 2002). Assim, a prevenção de erros epigenéticos tem sido sugerida como uma chave 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 mostra-se um componente crucial no processo de clonagem (Fu et al., 2008; Wani et al., 2010).

2.5. Linhagens celulares

Após o sucesso do processo de clonagem com células somáticas adultas (Wilmut et al., 1997), começou-se 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 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, mais de 200 tipos celulares foram claramente distinguíveis pela morfologia e, provavelmente, muitos mais seriam descobertos quando marcadores moleculares melhores estivessem disponíveis (Oback e Wells, 2002). Porém, menos de 5% desses tipos celulares tinham sido testados como doadores de núcleo na TN (Oback e Wells, 2002), tais como 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 um desenvolvimento embrionário, sendo que os

núcleos das células que são relativamente menos diferenciadas suportam melhor o completo desenvolvimento, comparados com aquelas células que estão totalmente diferenciadas (Hochedlinger e Jaenisch, 2002).

O estabelecimento de linhagens de células-tronco pluripotentes nas espécies domésticas poderia ter um grande impacto na pecuária, assim como no campo da biomedicina (Dev et al., 2012b).

O estado intermediário entre células-tronco adultas e embrionárias tornam as células-tronco fetais candidatas ideais à reprogramação ao estado multipotente (Abdulrazzak et al., 2010).

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

Acredita-se que as células fetais têm menor quantidade de mutações e maior habilidade proliferativa, como mensurado por duplicação celular, do que células somáticas adultas, e assim, elas têm sido preferidas como doadoras de núcleo para clonagem (Miyoshi et al., 2003).

Dois tipos celulares estudados em humanos e recentemente em animais domésticos, por suas características de células-tronco mesenquimais, são as células provenientes dos anexos fetais (células do fluido amniótico e células do cordão umbilical). E ainda, um terceiro tipo celular, com características muito similares, mas nem sempre idênticas às das células-tronco mesenquimais, são as células-tronco isoladas do tecido adiposo (Strem et al., 2005). Embora neste trabalho tenha sido adotado essa classificação para as células do tecido adiposo, alguns autores, como

Wagner et al. (2005) e de Mattos Carvalho et al. (2009), caracterizam em seus trabalhos esse tipo de células como células-tronco mesenquimais, demonstrando que ainda há controvérsia entre diferentes grupos de pesquisa.

2.5.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell*, MSC), também chamadas de células progenitoras mesenquimais (Karahuseyinoglu et al., 2007), representam um arquétipo das células-tronco somáticas multipotentes. As MSC 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 sua capacidade intrínseca de auto-regeneração e diferenciação em tipos celulares funcionais (Baksh et al., 2004).

Os critérios mínimos para se definir as MSC 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). E ainda, apresentar capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Pittenger et al., 1999).

As MSC são células com alto potencial de expansão *in vitro* e capacidade auto-regenerativa, que foram primeiramente isoladas da medula óssea (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Baksh et al., 2004). Entretanto, as MSC que residem dentro do microambiente da medula óssea são células tronco multipotentes adultas (Alviano et al., 2007), e têm o número celular, e 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 em limitado número de vezes antes de sofrer apoptose (D'Ippolito et al., 1999).

Dentro deste contexto, as células do cordão umbilical apresentam grande potencial para a utilização no processo de transferência nuclear em bovinos. O cordão umbilical tem sido recentemente proposto como uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais em vista das suas características pluripotentes, natureza não-invasiva do procedimento de isolamento e suas baixas implicações éticas (Corradetti et al., 2011).

O cordão umbilical é formado no começo da gestação, e envolve o saco vitelínico, que é a fonte embriológica de ambas as células germinativas primordiais e primeiras células-tronco hematopoiéticas (Carlin et al., 2006). Baseado em estudos funcionais e estruturais, ao menos seis zonas distintas são agora reconhecidas no cordão umbilical, entre elas está a região do estroma intervacular, chamado classicamente de geléia de Wharton - GW (Corradetti et al., 2011). Já para Troyer e Weiss (2008), a GW compreende as regiões perivascular, intervacular e sub-âmnio, das quais são isoladas MSC, porém, permanece não elucidado se elas representam populações celulares distintas (Karahuseyinoglu et al., 2007). Em equinos, populações celulares provenientes dos tecidos intervacular e perivascular foram cultivadas, e ambas as áreas expressaram marcadores específicos de células-tronco mesenquimais e de pluripotencialidade, e foram aptas a se diferenciar nas linhagens mesodérmica e ectodérmica (Corradetti et al., 2011).

A matriz do cordão umbilical ou geléia de Wharton é um tecido conectivo mucóide que envolve as duas artérias e a veia presentes nessa estrutura (Lovati et al., 2011). A geléia de Wharton é composta de células fibroblastóides especializadas e mastócitos ocasionais embebidos em uma substância rica em proteoglicanos, principalmente ácido hialurônico (Corradetti et al., 2011).

Uma das grandes vantagens na utilização das células do cordão umbilical é que esta estrutura é de origem embrionária e pode ser coletada após o nascimento (Carlin et al., 2006).

Em humanos, o epitélio amniótico é derivado da camada multipotente denominada de epiblasto, aproximadamente no oitavo dia de desenvolvimento embrionário, logo antes da gastrulação, que é o momento que esta camada começa a se tornar especializada. Uma vez que o âmnio se diferencia do epiblasto no período que retém sua pluripotencialidade, é possível especular que as células amnióticas embrionárias podem ter escapado da especificação celular que acompanha a gastrulação e que as células amnióticas preservem algumas, ou a maioria das características do epiblasto, tais como a pluripotencialidade (Miki e Strom, 2006).

A origem relatada por Miki e Strom (2006) refere-se ao epitélio amniótico e às células que o compõem, porém, segundo Kunisaki et al. (2007) a origem das células que compõem o fluido amniótico ainda é muito discutida. O líquido amniótico contém uma grande quantidade de células em suspensão, população celular que é variável com a fase da gestação e que traduz as mudanças na formação do líquido amniótico e da maturação fetal e de seus anexos (Fauza, 2004).

Diferentes origens foram sugeridas para a variedade de células presentes no líquido amniótico. Durante toda a gestação ocorre a liberação de diferentes tipos

celulares de origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica, dependendo principalmente da idade gestacional ou de patologias fetais. As células do líquido amniótico são provenientes, em sua maior parte, do epitélio e dos tratos digestivo e urinário do feto e do âmnio. (Bydlowski et al., 2009).

Entretanto, o que se sabe é que a maioria das células presentes são terminalmente diferenciadas e tem limitada capacidade proliferativa (Siegel et al., 2007). Apesar disso, inúmeros estudos têm demonstrado a presença de um subconjunto de células com potencial de proliferação e diferenciação (Abdulrazzak et al., 2010).

A habilidade de crescimento *in vitro* e a expressão de marcadores chave de pluripotência indicam as possibilidades de uso das células tronco do fluido amniótico na terapêutica veterinária e aplicação na reprodução assistida na pecuária (Dev et al., 2012b) e incluindo-as entre as células-tronco para uso na terapia regenerativa (Mauro et al., 2010).

Ao analisar-se as células do fluido amniótico humanas, observou-se a expressão de marcadores característicos de ambas células-tronco embrionárias e células-tronco mesenquimais. Também foi observada a habilidade de diferenciação nas três camadas germinativas, e de originar as linhagens neurogênicas, adipogênicas, osteogênicas, miogênicas e endotelial (De Coppi et al., 2007). Confirmando isso Zheng et al. (2009) observaram que as células derivadas do fluido amniótico de suínos foram diferenciadas em astrócitos, oligodendrócitos, neurônios, adipócitos, osteoblastos, miócitos e endotélio. Esse tipo celular, em suínos, cresce facilmente em cultivo e possui capacidade extensiva de auto-renovação, uma propriedade definida de células-tronco. Ainda, essas células foram positivas para marcadores de células-tronco e

pluripotencialidade, tais como POU5F1, THY1 e SOX2, indicando que as células estavam em estado indiferenciado.

As células derivadas do fluido amniótico podem aumentar a eficiência da clonagem, se o estado indiferenciado das células doadoras afetarem a taxa de sucesso, como observado com células-tronco embrionárias como doadoras de núcleo (Zheng et al., 2009).

2.5.2. Células-tronco multipotentes derivadas do tecido adiposo (*Multipotent Adipose-Derived Stem Cells, MADS*)

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 regenerativa em humanos é atraente, pois elas são abundantes e acessíveis. A gordura subcutânea pode ser coletadas seguindo procedimentos minimamente invasivos (Vallée et al., 2009) e permite a extração de grande volume de tecido com limitada morbidade (Rodriguez et al., 2005).

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

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. No entanto,

como as células do estroma do tecido adiposo representam uma população celular heterogênea, a evidência em favor da ocorrência de células-tronco com potencial de multi-linhagem ao nível de uma célula individualmente, permanece para ser demonstrado *in vitro* e *in vivo* (Rodriguez et al., 2004).

Strem et al. (2005), relataram que as MADS possuem muitas características em comum com as MSC. A primeira característica em comum que pode ser citada é a grande similaridade no padrão de expressão de marcadores de superfície. Outra característica é a capacidade de diferenciação nas linhagens mesenquimais: adipogênica, condrogênica, osteogênica e miogênica. Esse conjunto de propriedades funcionais é muito semelhante, embora nem sempre idêntico, ao das MSC.

As MADS humanas 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 das células-tronco derivadas de adipócitos, fazem com que elas se tornem atrativas como fonte de células para o procedimento de TN em animais domésticos.

3. HIPÓTESES

É possível isolar, cultivar e criopreservar células do líquido amniótico, cordão umbilical e tecido adiposo coletadas durante a prenhez e parto de bovinos;

A utilização destes tipos celulares pode melhorar a eficiência da produção de embriões bovinos por meio da técnica de transferência nuclear (TN).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Estabelecer metodologia de isolamento e cultivo para células do tecido adiposo, da geléia de Wharton do cordão umbilical e do fluido amniótico provenientes de bovinos vivos e determinar a eficiência de cada tipo celular em produzir embriões bovinos por transferência nuclear (TN).

4.2. Objetivos específicos

- Isolar células amnióticas durante prenhez de fetos bovinos com mínimo de prejuízo para o feto;
- Determinar qual o melhor meio para o cultivo das células amnióticas;
- Determinar qual a melhor solução crioprotetora para células amnióticas;
- Isolar, cultivar e criopreservar células da geléia de Wharton do cordão umbilical coletado no momento do parto de bovinos;
- Isolar, cultivar e criopreservar células do tecido adiposo coletadas por meio de biópsia tecidual em bovinos;
- Determinar qual o melhor tipo celular a ser utilizado na clonagem bovina através da produção embrionária, número de gestações e indivíduos nascidos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local

O experimento foi realizado no Centro de Transferência de Tecnologias em Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira-CTZL, na Embrapa Cerrados e na Universidade de Brasília, localizados em Brasília – Distrito Federal.

5.2. Delineamento experimental

FASE I

As células do fluido amniótico (CFA) foram primeiramente obtidas de úteros gravídicos de abatedouro e com elas foram realizados dois experimentos, um para testar o meio de cultivo mais adequado para promover o seu crescimento e outro para avaliar a solução crioprotetora mais eficiente em preservar as células isoladas (Figura 1).

Quando as células atingiram confluência celular nas garrafas de cultivo, foram criopreservadas, em uma primeira etapa, em três soluções crioprotetoras, contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 5% de dimetilformamida (DMF) e 7% de glicerol, todos em Amniomax Complete II® (Gibco-BRL/ Life Technologies, Rockville, MD USA), e em uma segunda etapa, após a determinação do melhor crioprotetor, este foi o único utilizado, para todos os tipos celulares.

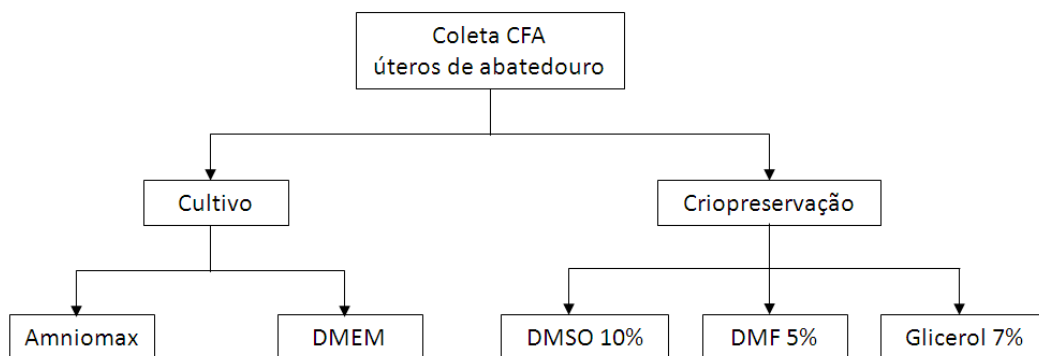


Figura 1. Esquema da primeira fase do projeto. Isolamento, cultivo e criopreservação de células do fluido amniótico (CFA) provenientes de úteros de abatedouros em diferentes meios e soluções crioprotetoras.

FASE II

Nessa etapa verificou-se a possibilidade da obtenção do fluido amniótico de quatro animais com prenhez entre 60 e 74 dias, para isolamento e cultivo das células amnióticas. O material de um animal foi contaminado e descartado. Das três prenhez restantes, uma se deu a campo e não foi possível realizar a coleta do cordão umbilical. Duas gestações foram acompanhadas até o momento do parto, nos quais o material do cordão umbilical foi recuperado. Os animais nascidos foram acompanhados até os sete meses de idade e o tecido adiposo foi coletado por meio de biópsias de pele da região perineal. As células da geleia de Wharton (CGW) do cordão umbilical e do tecido adiposo (CTA) foram isoladas e mantidas em meio de cultivo DMEM (Dubelccos Modified Eagle Medium, Invitrogen Life Science, USA) com soro fetal bovino (SFB), já as células amnióticas foram cultivadas em meio Amniomax Complete II.

Os diferentes tipos celulares foram cultivados por várias passagens e criopreservados em seu meio de cultivo acrescido de 10% de DMSO. A sobrevivência celular pós-descongelamento foi avaliada utilizando-se o corante azul de Trypan 0,4%, e a integridade do DNA pelo método de TUNEL.

Microscopia eletrônica de varredura foi realizada nas CFA, CGW, CTA para caracterização e comparação morfológica entre os diferentes tipos celulares.

As células armazenadas de um animal fêmea da raça Guzerá, filha da fêmea 08032, foram utilizadas para produção de embriões por meio de transferência de núcleos em ovócitos bovinos maturados (clonagem). Alguns dos embriões produzidos foram transferidos para fêmeas receptoras síncronas.

5.3. Análise estatística

O delineamento experimental foi o Inteiramente Casualizado (DIC), com quatro repetições. Os tratamentos foram compostos por: T1 – CTA, T2 – CFA e T3 – CGW. Para as variáveis em formato de porcentagens foi realizada a transformação “arco seno raiz(x/100)”. A verificação estatística da significância dos tratamentos foi feita pela Análise de Variância (ANOVA). Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises foram realizadas pelo software estatístico SAS versão 9.1.2.

5.4. Obtenção de células do fluido amniótico (CFA) de úteros gravídicos de abatedouro

Para o isolamento das CFA, primeiramente, foram utilizados quatro úteros gravídicos com desenvolvimento fetal por volta de 60 a 90 dias. O material foi coletado

em frigorífico próximo e levado imediatamente para o laboratório do CTZL. Os úteros sofreram assepsia com álcool 70% e em seguida foram colocados em cuba metálica estéril e levados para o fluxo laminar para a aspiração do líquido amniótico.

As camadas uterinas foram dissecadas (Figura 2) até a visualização do saco alantoideano e do saco amniótico delimitando o feto bovino. O saco amniótico foi fixado e uma agulha 40x12 estéril acoplada a uma seringa de 20 mL foi introduzida, ultrapassando a membrana do alantóide e em seguida a membrana do saco vitelino, atingindo o líquido amniótico sem atingir o feto (Figura 2).

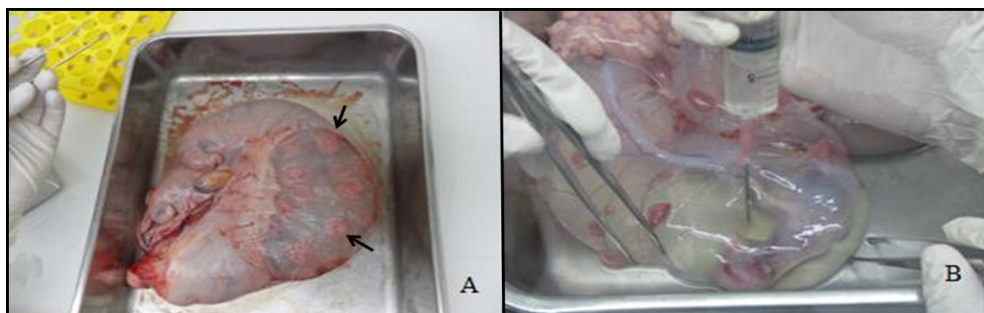


Figura 2. A) Dissecação das camadas uterinas. Observar os placentomas (setas); B) Aspiração do fluido amniótico para isolamento das células amnióticas.

Em seguida, 15 a 20 mL foram coletados e o fluido foi dividido em duas frações em tubos tipo falcon de 15 mL e centrifugado a 300 g por 5 minutos, para promover a precipitação das células do fluido amniótico.

5.5. Determinação do melhor meio para cultivo de células amnióticas

Após a centrifugação, o sedimento celular de um tubo foi ressuspenso em 3 mL de DMEM (10% de SFB e 1 µl/mL de penicilina e estreptomicina) e do outro tubo em 3

mL de Amniomax Complete II. O material de cada tubo com as células diluídas nos dois meios de cultivo foi depositado em garrafa de cultivo de 25 cm² e colocado para cultivo em estufa com 5% de CO₂, 38,5°C e 90% de umidade. As garrafas permaneceram em cultivo para a realização da avaliação de crescimento celular e tempo de confluência em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100/TS100-F) em aumento de 100 e 200 x.

5.6. Criopreservação de células amnióticas e determinação da melhor solução crioprotetora

Após o isolamento celular realizado a partir de úteros gravídicos provenientes de abatedouro, o crescimento celular em meio Amniomax Complete II foi acompanhado e ao atingir a confluência celular nas garrafas de cultivo, todo meio foi retirado e 1 mL de tripsina-EDTA foi adicionado para dispersão das células. Após 5 minutos de incubação com a tripsina-EDTA, 1 mL de Amniomax foi adicionado para bloquear a ação da tripsina. Em seguida todo o meio foi dividido em tubos de 1,5 mL e centrifugado a 2000 g por 5 minutos para precipitação das células. Após este procedimento, o sedimento formado foi diluído com as seguintes soluções de criopreservação:

- 1- Amniomax Complete II com 10% de DMSO;
- 2- Amniomax Complete II com 5% de DMF;
- 3- Amniomax Complete II com 7% de Glicerol.

As soluções de criopreservação contendo as células foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e congeladas a – 80 °C por 24 horas. Ao final deste período todas as amostras foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido.

As amostras permaneceram armazenadas em botijões criogênicos por um mês e posteriormente foram descongeladas para avaliação da eficiência de proteção de cada solução de criopreservação. As células foram descongeladas por 5 segundos ao ar e 20 segundos em banho-maria a 36°C para avaliação de viabilidade celular utilizando-se o corante Trypan Blue (Item 5.9.1).

5.7. Isolamento *in vivo* e cultivo *in vitro* dos diferentes tipos celulares

Com o isolamento de células do fluido amniótico de úteros provenientes de abatedouro realizado com sucesso, procedeu-se o estudo para verificar a possibilidade de isolamento *in vivo*, criopreservação e utilização dos três tipos celulares (células amnióticas, do cordão umbilical e do tecido adiposo) na TN (Figura 3).

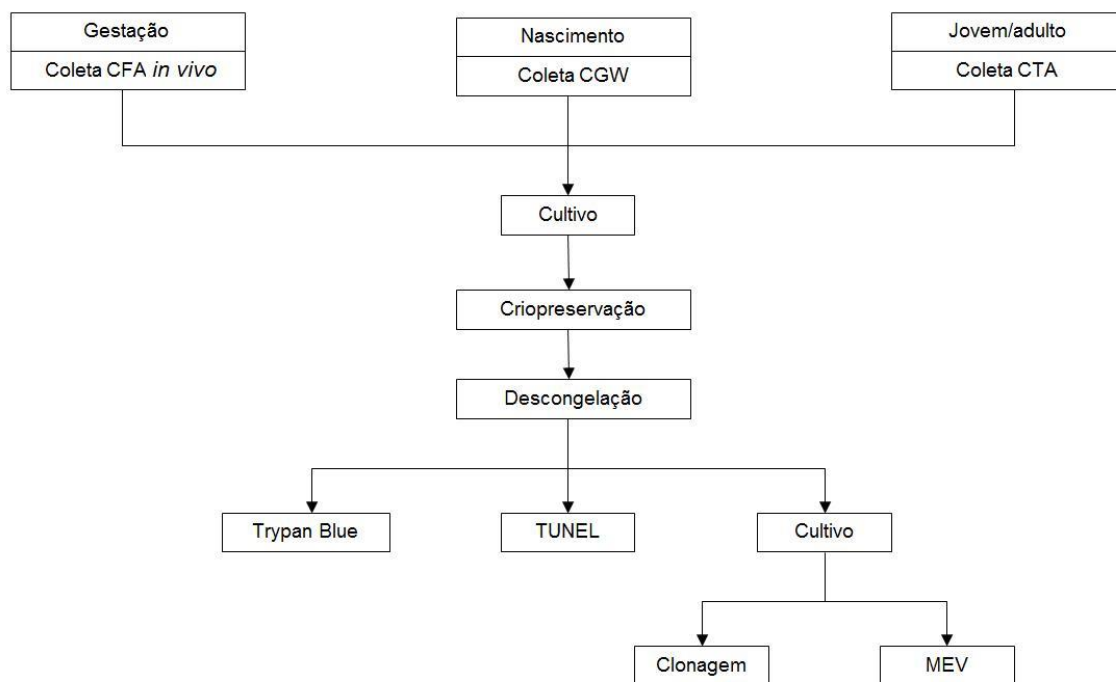


Figura 3. Etapas da utilização das células isoladas *in vivo*. CFA: células do fluido amniótico; CGW: células da geleia de Wharton; CTA: células do tecido adiposo; MEV: microscopia eletrônica de varredura.

5.7.1. Isolamento das células do fluido amniótico (CFA)

Uma sequência de inseminações artificiais (IA) com sêmen convencional foi realizada entre 03/05/2010 e 07/05/2010 (Tabela 2), com o objetivo de se obter prenhez para isolamento das células amnióticas.

Conjuntamente com as IA's foi realizado um treinamento com úteros obtidos de frigoríficos, com o objetivo de testar o sistema de aspiração do líquido amniótico guiado por ultrassom a ser realizado em animais vivos.

Cinco gestações foram estabelecidas e as aspirações para recuperação das células do fluido amniótico foram realizadas com 60 a 74 dias de gestação.

Tabela 1: Inseminações artificiais e estabelecimento de prenhez para a obtenção das células do fluido amniótico.

Ordem	Identificação da fêmea inseminada	Data da IA	Raça do touro	Diagnóstico de gestação
1	06043	03/05/2010	Gir	Negativo
2	08032	03/05/2010	Guzerá	Positivo
3	02028	05/05/2010	Guzerá	Positivo
4	01011	06/05/2010	Holandês	Positivo
5	04036	07/05/2010	Holandês	Positivo
6	02052	07/05/2010	Holandês	Positivo

Em julho de 2010 foram realizadas as aspirações do fluido amniótico de quatro animais vivos por meio de ultrassonografia para a obtenção das células de interesse.

A amniocentese foi realizada como descrito a seguir. A região da vulva e vagina de cada animal foi desinfetada com iodo e álcool 70% após indução de anestesia epidural com lidocaína 2%. A vagina sofreu anti-sepsia com solução de Kilol[®]-L e em seguida um transdutor convexo de 7,5 MHz conectado um ecógrafo Honda (HS-1500V) foi coberto com uma camisinha sanitária e introduzida até o fundo vaginal. O útero então foi retraído manualmente pelo reto, para que o corno gestante ficasse justaposto com a parede da vagina. O transdutor foi equipado com uma agulha de 21 g com comprimento de 65 cm, localizada na ponta da sonda (Figura 4A). Todo procedimento foi monitorado através da imagem do ultrassom, para um correto posicionamento entre a vesícula amniótica-alantoideana e a guia da agulha (Figura 4B). Quando a área não ecogênica, representando líquido amniótico foi observada claramente no monitor, a ponta da agulha foi inserida por um técnico auxiliar, sob a coordenação do operador do ultrassom. Após a penetração da parede vaginal, a agulha foi introduzida na vesícula amniótica-alantoideana.

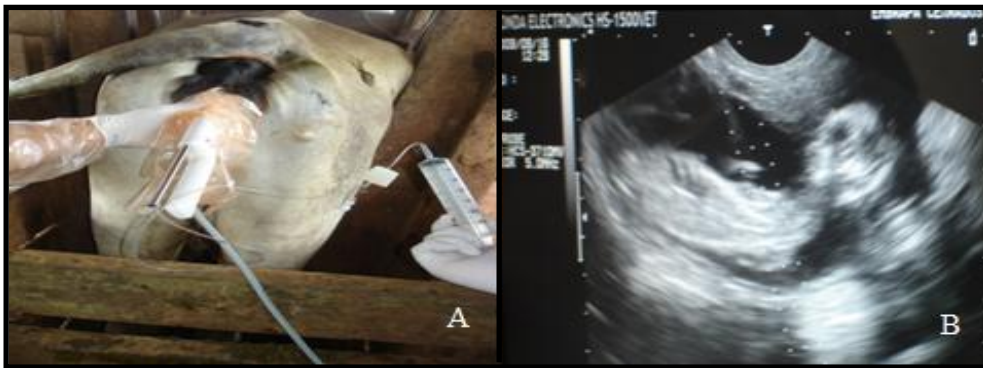


Figura 4: A) Sistema utilizado para aspiração *in vivo* de líquido amniótico; B) Imagem ultrassonográfica demonstrando o correto posicionamento do feto no momento da coleta do líquido amniótico, as três linhas tracejadas apontam a orientação da saída da agulha.

Logo que a agulha atingiu o líquido amniótico, cerca de 7 mL de fluido foi aspirado com o auxílio de uma seringa estéril de 60 mL. A correta localização foi definida pela confirmação das imagens das partes do corpo fetal, membranas alanto-amniótica e alanto-coriônica e parede uterina. Procurou-se preservar uma quantidade mínima de líquido amniótico para que a prenhez fosse mantida. Mesmo com esse cuidado, verificou-se o aborto em um animal.

O material foi levado ao laboratório, centrifugado a 135 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio Amniomax Complete II, o melhor para o crescimento desse tipo celular (Item 5.5). As células foram cultivadas em garrafa especial de cultivo com mais 2 mL de meio em estufa com 5% de CO₂, 90% de umidade e temperatura de 38,5°C.

O crescimento celular foi observado após uma semana de incubação, estabelecendo-se dessa forma o protocolo e a viabilidade do isolamento de células amnióticas *in vivo* por aspiração em animais prenhes.

Um animal que sofreu aspiração do líquido amniótico abortou após o procedimento, enquanto os outros três apresentaram gestação normal e pariram fetos saudáveis, sendo que em dois deles procedeu-se a coleta do cordão umbilical e do tecido adiposo.

5.7.2. Isolamento das células da geleia de Wharton do cordão umbilical (CGW)

O material de cordão umbilical foi coletado durante o parto da vaca 08032 no CTZL, no dia 12 de fevereiro de 2011, uma das vacas em que se procedeu a amniocentese, criando-se assim, um criobanco de diferentes tipos celulares do mesmo animal. O parto do animal foi induzido com 10 mL de dexametasona e 2 mL de clorprostenol sódico (prostaglandina sintética) aplicados no dia 10/02/2011, por via intramuscular para que no momento do parto uma equipe pudesse acompanhá-lo. No parto assistido realizou-se a coleta de um fragmento de cerca de 5 cm dos vasos e da geleia umbilical (Figura 5). Este fragmento foi levado ao laboratório em solução tampão *phosphate-buffered saline* (PBS) a 37°C, onde foi lavado com a mesma solução para completa retirada do sangue remanescente e de impurezas. A região dos vasos do cordão umbilical e da geleia de Wharton (Figura 5) foi cortada em pequenos fragmentos (cerca de 1 mm³) que foram depositados no fundo de placa de Petri para aderência do material.

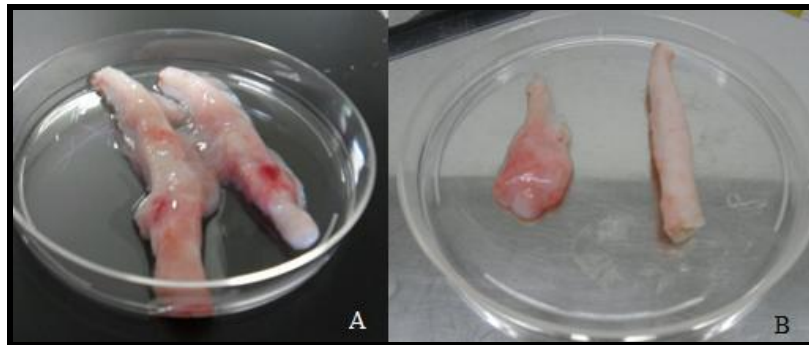


Figura 5: A) Fragmento do cordão umbilical coletado no momento do parto de bezerros bovinos; B) Fragmento da geleia de Wharton (esquerda) e fragmento do vaso do cordão umbilical (direita), ambas as estruturas foram cultivadas para isolamento celular.

As biópsias foram levemente pressionadas contra o fundo das placas de Petri para melhorar a fixação das mesmas. Após alguns minutos para o estabelecimento deste contato, foi adicionado meio DMEM para cobrir todas as biópsias (Figura 6). 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, e as células isoladas foram cultivadas por mais sete dias nas mesmas condições. Após este período, as células isoladas no fundo da placa foram ressuspensas pela ação de tripsina e depositadas em garrafas de cultivo para aumentar seu número e atingirem confluência celular para então serem criopreservadas.

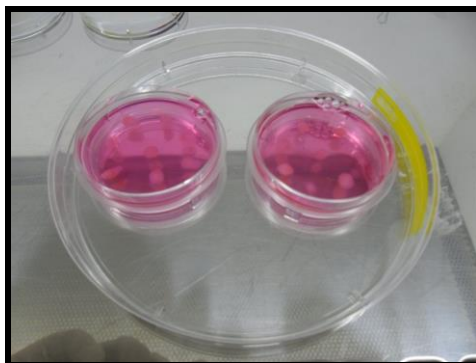


Figura 6: Placas com fragmentos do cordão umbilical cobertos com DMEM que foram posteriormente levadas para estufa para a proliferação celular.

5.7.3. Isolamento das células do tecido adiposo (CTA)

O isolamento das células adiposas foi realizado no animal aos sete meses de idade (Figura 7B), no dia 5 de setembro de 2011. Uma biópsia de pele e tecido subcutâneo com tecido adiposo foi realizada na região perineal, abaixo do ânus e acima da vulva (animal fêmea).



Figura 7: Fêmea Guzerá Leiteira que atualmente possui células amnióticas, da geleia de Wharton e adiposas conservadas em botijão criogênico. A) animal logo após o nascimento, quando se procedeu a coleta do cordão umbilical; B) o mesmo animal com sete meses de idade, no momento da coleta do tecido adiposo; C) o mesmo animal com 20 meses de idade.

Os animais sofreram anestesia epidural com lidocaína 2%, a região da coleta foi tricotomizada, higienizada e a anti-sepsia foi feita com álcool iodado. A biópsia foi coletada (Figura 8) e imediatamente imersa em PBS a 37°C. O local da biópsia foi suturado com pontos simples isolados. No laboratório, o procedimento de cultivo das células foi o mesmo das células do cordão umbilical (Item 5.7.2).



Figura 8: Procedimento de coleta de biópsia de tecido adiposo em bovino com sete meses de idade, na região perineal.

5.8. Criopreservação dos diferentes tipos celulares

As CTA e as CGW isoladas e cultivadas foram criopreservadas em DMEM, 10% de SFB e 10% de DMSO. E as CFA isoladas *in vivo*, foram congeladas em Amniomax e 10% de DMSO.

Quando atingiram a confluência, as células em cultivo foram tratadas com tripsina-EDTA durante 5 minutos para desprendimento das células, e centrifugadas a 2000 g por 5 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com a solução crioprotetora. Em seguida, as células foram alocadas em palhetas de 0,25 mL e armazenadas em freezer -80°C por 24 horas e finalmente mergulhadas em nitrogênio líquido, em que

permaneceram armazenadas até o momento de realizar as análises de viabilidade celular e integridade de núcleo, ou o novo cultivo para transferência nuclear ou ainda para avaliação em MEV.

5.9. Avaliação da viabilidade celular pós-criopreservação

5.9.1. Avaliação de integridade de membrana

A viabilidade das células isoladas e criopreservadas foi monitorada pela avaliação de integridade da membrana plasmática com o corante de exclusão de células vivas e mortas Trypan Blue 0,4%. Para isso, o corante foi adicionado na proporção de 1:1 com a suspensão celular, a mistura permaneceu em banho-maria a 36°C por 10 minutos e posteriormente, foi feita a avaliação em microscópio de campo claro, onde foram observadas 200 células e classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com sua coloração.

5.9.2. Avaliação de integridade de DNA

A integridade do DNA das células foi avaliada pela técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*). Para isto, foi utilizado o kit “*In Situ Cell Death Detection*”, fluoresceína, de acordo com os fabricantes (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

A descongelação das palhetas com células na primeira passagem (P1) do cultivo procedeu-se durante 5 segundos no ar e 20 segundos em banho-maria a 36°C.

Inicialmente, as células somáticas foram lavadas em 1 mL de PBS suplementado com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) a 37°C. As suspensões celulares foram fixadas com 1 mL de paraformaldeído a 4% por 1 h à temperatura ambiente. As células

foram lavadas novamente com PBS (0,1% de BSA) e permeabilizadas no gelo com Triton X-100 a 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 1 h. Então, as células permeabilizadas foram lavadas uma vez em PBS (0,1% de BSA) e incubadas em câmara úmida no escuro a 37°C por 1 h com a mistura da reação de TUNEL, contendo “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) com dUTP label (nucleotídeos marcados). Em seguida, as células foram lavadas com PBS (0,1% de BSA) e contra-coradas com Hoechst 33342 (5 µg/ml) para visualizar o DNA genômico total. Controles negativo (não adicionando TdT a mistura da reação de TUNEL) e positivo (usando somente DNase I, 1 mg/ml por 30 min na temperatura ambiente) foram realizados em cada amostra. Para cada amostra testada foram contadas, no mínimo 100 células, utilizando microscópio de fluorescência. Cada célula foi notificada como normal (fluorescência nuclear azul devido ao Hoechst 33342) ou com fragmentação de DNA (fluorescência nuclear verde). A porcentagem final de células com fragmentação de DNA foi denominada como TUNEL positivo (%).

5.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos tipos celulares

Para o processamento das amostras para a MEV, foi estabelecido o cultivo celular após descongelação. As passagens utilizadas foram P8 para as CGW e CTA; e P9 para as CFA. As células foram cultivadas em lamínulas acondicionadas no fundo de placas de cultivo de seis poços. Após verificação de crescimento celular, todo o meio de cultivo foi retirado e as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS a 37°C na própria lamínula, para completa retirada do meio. As células foram incubadas na solução fixadora composta de 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 1 h. Logo após, as células foram

lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 30 min com tetróxido de ósmio 1% e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). A desidratação foi realizada em soluções com concentrações crescentes de acetona (50% até 100%). As amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico de CO₂ e metalizadas com ouro. As análises foram feitas em microscópio eletrônico de varredura Jeol 7001.

5.11. Transferência nuclear

5.11.1. Maturação *in vitro* dos ovócitos

Ovários foram obtidos de abatedouros e mantidos em solução fisiológica (0,9% de NaCl em água destilada) a 32°C durante o transporte até o laboratório. Complexos cumulus-ovócitos (CCO) foram aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro na superfície do ovário, via uma agulha hipodérmica (diâmetro interno de 1,2 mm) e seringa de 20 mL e colocados dentro de tubos estéreis de 15 mL. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C, onde o aspirado folicular permaneceu por 10 a 15 minutos. O material folicular que sedimentou foi coletado e diluído em meio de lavagem (LAV) (TCM 199 Sais de Hank's com HEPES acrescido de 10% de SFB e 1 µL/mL de solução de penicilina/estreptomicina), e então transferido para placa de Petri de 100 mm e examinado para CCO sob estereomicroscópio (Nikon SMZ-10). Complexos com no mínimo duas camadas de células do cumulus compactas e não-atréticas e citoplasma homogêneo e escuro foram selecionados e transferidos para as gotas do meio de maturação (MIV), composto de meio TCM 199 sais de Earl's, suplementado com 10% de SFB, 12 µL/mL de LH, 10 µL/mL de FSH, 10 µL/mL de L-glutamina e 1 µL/mL de solução de penicilina/estreptomicina, cobertas com óleo mineral, numa

proporção de 30 a 35 CCO por gota de 200 μ L. CCO foram cultivados por 18 h em incubadora a 38,5°C e 5% CO₂.

5.11.2. Transferência nuclear com os três tipos celulares

Foram feitas quatro repetições de procedimentos de TN para cada tipo celular, da seguinte forma:

Desnudamento. Após as 18 h de maturação, os ovócitos foram desnudados pela ação de hialuronidase 0,2% por 5 minutos e repetidas pipetagens, por mais 5 minutos. Foram selecionados os ovócitos que apresentaram o primeiro corpúsculo polar evidente. Os ovócitos selecionados foram incubados em citocalasina D (2,5 mg/mL) e Hoescht 33342 (1 mg/mL) diluídos em 1 mL de meio MIV, por 10 minutos para marcação do núcleo dos ovócitos.

Preparação das células. As células encontravam-se em confluência por no mínimo dois dias antes do procedimento de TN e, portanto, presuntivamente, no estágio G0 do ciclo celular. Os tipos celulares foram descolados por ação da tripsina e uma pequena quantidade de solução contendo as células foi adicionada às placas contendo os ovócitos já com o núcleo marcado. Essa placa foi levada ao micromanipulador para as etapas subsequentes.

Enucleação. O procedimento de transferência de núcleo foi realizado com auxílio de micromanipulador (dois sistemas de microinjeção hidráulicos e dois sistemas de micromanipulação eletrônicos). Os ovócitos foram enucleados em meio LAV, com uma micropipeta de vidro com 30 μ m de diâmetro, por aspiração do primeiro corpúsculo polar e da placa metafásica. A enucleação foi confirmada pela exposição do material à luz ultravioleta (UV) e observação do núcleo corado em azul fluorescente.

Microinjeção e reconstrução. Os ovócitos finalmente foram reconstruídos com os tipos celulares (adiposas, amnióticas e geleia de Wharton). A reconstrução foi realizada inserindo com a micropipeta, pelo mesmo orifício da enucleação, uma única célula no espaço perivitelino.

Eletrofusão. Os conjuntos ovócitos-células somáticas foram depositados em meio com manitol 0,3 M em uma câmara com dois eletrodos conectados ao eletrofusor “Cell fusion and activation system Voltain EP-1”. As estruturas reconstruídas foram manualmente alinhadas para que a superfície de contato entre a membrana do ovócito e a célula doadora estivesse paralela aos eletrodos. A fusão celular foi induzida por dois pulsos elétricos de 2,5 kV/cm por 65 μ s. Após o estímulo elétrico, os embriões reconstruídos foram lavados em meio LAV e levados para estufa por no mínimo 30 min. Após este período, a taxa da primeira eletrofusão foi avaliada. As estruturas degeneradas foram retiradas e as que não apresentaram a célula fusionada foram submetidas a outro ciclo de fusão executado da mesma maneira que o primeiro. Após no mínimo 30 min, as estruturas foram verificadas e a taxa da segunda eletrofusão avaliada. Após uma a três horas da fusão, as estruturas foram ativadas.

Ativação. Os embriões reconstruídos e os ovócitos do grupo controle (intactos) foram ativados em meio com 5 μ M de ionomicina por 5 min e em seguida foram incubados em 1,9 mM de 6-DMAP (6-dimethylaminopurine) por 4 h.

Cultivo. Finalmente, as estruturas foram cultivadas em meio fluido de oviduto sintético - SOF com 5% de SFB e com co-cultura de células do *cumulus* por até oito dias. A taxa de clivagem foi avaliada no segundo dia de cultivo, D2, e a taxa de blastocisto nos D7 e D8. Na existência de fêmeas receptoras com o ciclo reprodutivo

sincronizado, blastocistos provenientes de todos os tipos celulares foram inovulados nessas fêmeas.

5.12. Transferência dos embriões e monitoramento da gestação

As receptoras foram sincronizadas por meio de aplicação de 2 mL de clorprostenol sódico três dias antes do procedimento de TN. Os cios de vacas provenientes desse protocolo e também cios naturais foram observados no dia da TN. No sétimo dia seguinte do estro (estro=D0=dia da TN), dependendo da qualidade embrionária e da quantidade de receptoras disponíveis, um ou dois blastocistos em LAV foram envasados em palheta de 0,25 mL e transferidos não cirurgicamente dentro do lúmen uterino ipsilateral ao corpo lúteo.

Usando ultrassonografia, o diagnóstico de gestação das fêmeas receptoras foi determinado no D35 da gestação. O desenvolvimento da gestação foi monitorado nos dias 45, 60 e a partir daí a cada 30 dias.

6. RESULTADOS

6.1. Determinação do melhor meio de cultivo para as células amnióticas coletadas de úteros de vacas de abatedouro

A tabela 3 apresenta os dados obtidos com o cultivo nos dois meios testados, mostrando que o melhor meio de cultivo a ser utilizado neste caso é o Amniomax Complete II, meio específico para as células amnióticas.

Tabela 2. Cultivo de células do fluido amniótico em meio DMEM e Amniomax Complete II.

Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
Crescimento celular em meio DMEM	Sim	Sim	Não	Não
Crescimento celular em meio Amniomax	Sim	Sim	Sim	Sim
Confluência celular em meio DMEM (dias)	Não ocorreu	Não ocorreu	Não ocorreu	Não ocorreu
Confluência celular em meio Amniomax (dias)	20 dias	22 dias	22 dias	21 dias

A partir destes resultados, o projeto foi redirecionado para utilizar somente o meio Amniomax Complete II para o cultivo das células do fluido amniótico, para em seguida estudar a eficiência de diferentes soluções crioprotetoras durante a congelação de células amnióticas obtidas de peças de frigorífico.

6.2. Determinação da melhor solução crioprotetora para as células amnióticas coletadas de úteros de vacas de abatedouro

Os dados de viabilidade celular pós-descongelação estão expressos na Figura 9. O meio crioprotetor com DMSO preservou $84,50 \pm 9,53\%$ das células amnióticas com membrana íntegra, sendo superior ao meio crioprotetor com DMF que preservou $42,00 \pm 13,92\%$ do mesmo tipo celular. O meio crioprotetor com glicerol preservou $63,00 \pm 18,18\%$ das células e não diferiu dos outros tratamentos, considerando $P < 0,05$.

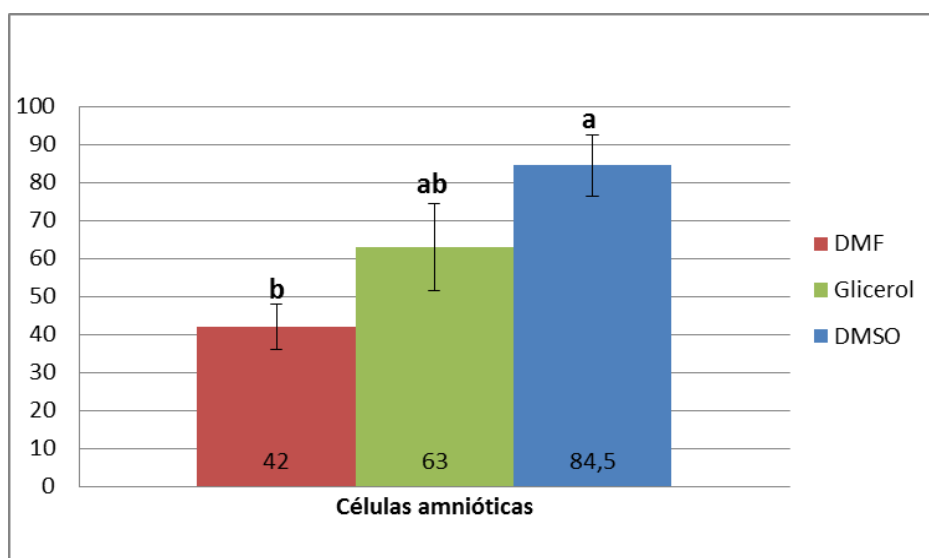


Figura 9. Viabilidade das células amnióticas após a criopreservação nas diferentes moléculas crioprotetoras em meio Amniomax Complete II. Nas colunas, letras diferentes representam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar de DMSO e glicerol não diferirem estatisticamente, pode-se observar uma diferença numérica superior de quase 20%, para o DMSO, desta forma optou-se pela congelação com este crioprotetor para as células coletada *in vivo*.

6.3. Isolamento *in vivo* e cultivo *in vitro* dos diferentes tipos celulares

Foi possível recuperar células amnióticas por aspiração do líquido amniótico durante os períodos de 64 a 70 dias de gestação, sendo o período de 64 dias mais indicado, devido à facilidade de manipulação pelo menor tamanho do feto. No entanto, o procedimento é invasivo e pode causar abortos, caso não sejam tomados todos os cuidados.

Nos animais com gestação por volta dos 70 dias foi encontrada muita dificuldade de perfuração do saco amniótico devido ao estágio adiantado de desenvolvimento do feto, dificultando a manipulação e assim pouco líquido foi aspirado.

Foi possível coletar o cordão umbilical e isolar células desta região de bovinos, procedimento que exige atenção ao momento do parto.

Também foi possível isolar células adiposas por meio de biópsia em animais vivos, procedimento seguro, simples, que exige apenas uma boa contenção do animal, anestesia local e cuidados com curativos e retirada dos pontos.

Desta forma, com esta última etapa de isolamento celular, foi criado um banco composto de células amnióticas, do cordão umbilical e adiposas, cujas características morfológicas em garrafa de cultivo estão ilustradas na Figura 10.

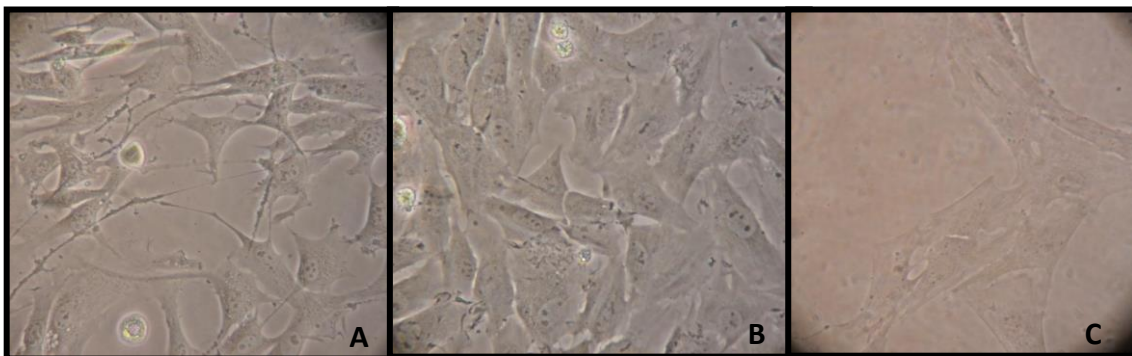


Figura 10: Aspectos morfológicos dos três tipos celulares em oitava passagem. A) Células adiposas; B) Células amnióticas; C) Células da geléia de Wharton. Aumento de 400 x.

6.4. Avaliação de integridade de DNA

Todos os tipos celulares apresentaram integridade de DNA de 100%, pelo método de TUNEL (Figura 11), ou seja, não houve fragmentação do DNA das células em primeira passagem, após descongelamento, seja esse causado pela curva de congelamento ou até mesmo por ação do crioprotetor.

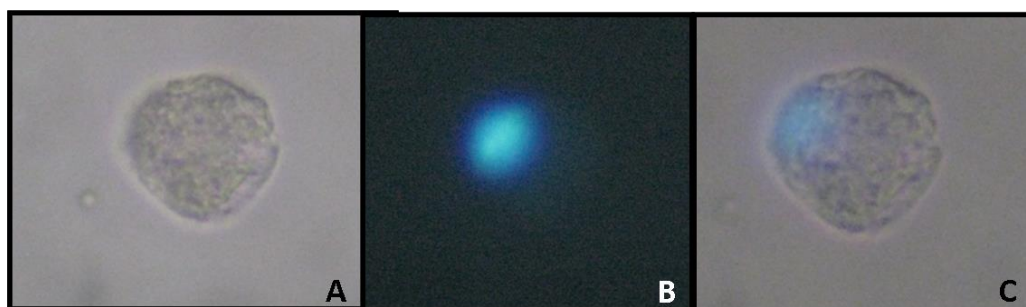


Figura 11. Avaliação de integridade de DNA pelo método TUNEL. A) célula sob microscopia de campo claro; B) célula sob incidência de luz UV demonstrando núcleo fluorescente; C) microscopia de campo claro e luz UV, onde pode-se observar a célula inteira e o núcleo corado em azul. Aumento de 1000 x.

6.5. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise morfológica por meio de microscópio eletrônico de varredura encontra-se na Figura 12. Nas passagens observadas (P8 e P9), observou-se que a morfologia das células foi bem semelhante. As células amnióticas e da geléia de Wharton não assumiram uma forma definida, já as células adiposas assumiram um padrão mais fusiforme.

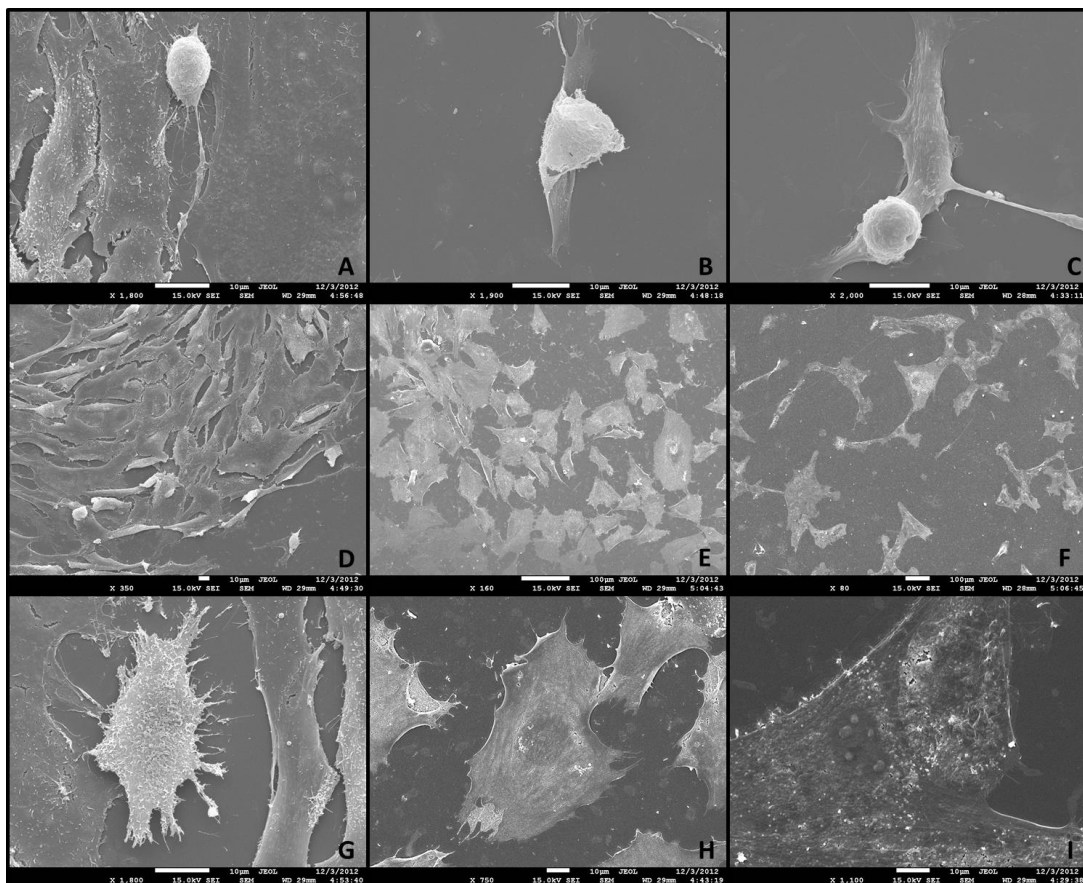


Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura de células do tecido adiposo (A, D, G), do fluido amniótico (B,E,H) e da geléia de Wharton (C,F,I). Em A, B e C) os diferentes tipos celulares em processo de aderência à placa de cultivo, quando sua fase está em transição de uma célula em suspensão, com forma arredondada, para uma célula aderida. Em D, E e F) a morfologia diferenciada do cultivo de cada tipo de célula. Células do tecido adiposo apresentaram morfologia fusiforme (D), já células amnióticas e da geléia de Wharton não apresentaram forma definida sob cultivo. Em G) uma célula do tecido adiposo com inúmeras projeções citoplasmáticas. Em H) uma célula do fluido amniótico ao centro com núcleo aparente. Em I) superfície de célula da geléia de Wharton.

6.6. Produção de embriões por meio de Transferência Nuclear

Os resultados referentes às quantidades de estruturas manipuladas (estruturas reconstruídas, fusionadas, degeneradas) e embriões produzidos em D2, D7 e D8, utilizando cada tipo celular encontram-se na Tabela 4.

Tabela 3. Quantidade de estruturas manipuladas em cada tipo celular e controle para produção de embriões bovinos clonados.

Tipo celular	Ovócitos selecionados	Ovócitos maturados	Estruturas reconstruídas	Estruturas degeneradas	Estruturas fusionadas	Estruturas clivadas	Blasto¹ em D7²	Blasto em D8³	Blasto total
Adiposa	605	429	209	29	90	35	10	6	16
Amniótica	611	432	156	31	109	44	18	0	18
Geléia de Wharton	612	440	179	23	107	44	23	4	27
Controle	147	-	-	-	-	116	52	11	63

¹ Blastocisto

² Sétimo dia de cultivo

³ Oitavo dia de cultivo

As taxas de maturação, eletrofusão, clivagem e produção de blastocistos (em D7, D8 e total) em relação ao número de estruturas fusionadas ou clivadas, expressos em porcentagem, encontram-se na Tabela 5.

O controle partenogénico foi feito somente para verificação do sistema de ativação e cultivo. Os valores referentes ao controle não foram comparados aos tratamentos na análise estatística.

A taxa de eletrofusão variou de forma significativa quando se utilizou diferentes tipos celulares, sendo que a maior fusão foi atingida quando se utilizou as células amnióticas como doadoras de núcleo ($85,89 \pm 9,93\%$), porém a mesma foi semelhante estatisticamente quando se utilizou as células da geléia de Wharton ($69,64 \pm 11,72\%$).

As taxas de clivagem mostraram-se muito próximas entre si, não havendo diferença significativa entre os valores ($38,26 \pm 13,94\%$, $39,08 \pm 6,09\%$ e $40,83 \pm 5,93\%$, para amnióticas, adiposas e geléia, respectivamente).

O número de embriões produzidos por manipulação variou de dois (células adiposas) a nove (células da geléia) e não foi observada diferença na morfologia dos embriões produzidos derivados de cada tipo celular.

Pode-se observar a produção embrionária tardia para as CTA e CGW, com blastocistos sendo observados no oitavo dia de cultivo *in vitro*.

Tabela 4. Comparação do desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos clonados com os diferentes tipos celulares.

Tipo celular	Taxa maturação	Taxa eletrofusão	Taxa clivagem	Taxa Blasto D7/F ¹	Taxa Blasto D7/C ²	Taxa Blasto D8/F ³	Taxa Blasto D8/C ⁴	Taxa Blasto total/F ⁵	Taxa Blasto total/C ⁶
Adiposa	70,91±4,83a*	50,07±10,64b	38,26±13,94a	11,92±11,83a	26,83±24,60a	5,94±7,04a	19,64±24,31a	17,87±7,98a	46,47±7,92a
Amniótica	70,67±4,43a	85,89±9,93a	39,08±6,09a	17,27±3,82a	45,46±13,03a	0a	0a	17,27±3,82a	45,46±13,03a
Geléia de Wharton	72,40±8,08a	69,64±11,72ab	40,83±5,93a	21,90±10,41a	52,67±21,54a	3,72±3,06a	10,00±9,34a	25,62±7,58a	62,67±15,15a
Controle	-	-	78,91±9,85	35,37±17,13	45,03±20,58	7,48±8,18	10,36±12,34	42,85±15,55	55,39±20,29

* Nas colunas, letras diferentes representam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Taxa de blastocistos observados no sétimo dia de cultivo (D7) em relação ao número de estruturas fusionadas.

² Taxa de blastocistos observados no sétimo dia de cultivo (D7) em relação ao número de estruturas clivadas.

³ Taxa de blastocistos observados no oitavo dia de cultivo (D8) em relação ao número de estruturas fusionadas, desconsiderando os blastocistos em D7.

⁴ Taxa de blastocistos observados no oitavo dia de cultivo (D8) em relação ao número de estruturas clivadas, desconsiderando os blastocistos em D7.

⁵ Taxa de blastocistos observados nos sétimo e oitavo dias de cultivo (D7+D8) em relação ao número de estruturas fusionadas.

⁶ Taxa de blastocistos observados nos sétimo e oitavo dias de cultivo (D7+D8) em relação ao número de estruturas clivadas.

6.7. Gestações e nascimento de embriões produzidos por TN

As inovulações dos embriões clonados produzidos foram realizadas de acordo com a disponibilidade de receptoras aptas. Devido ao pequeno número de embriões transferidos, a realização de análise estatística para comparação entre tratamentos não foi possível. Dessa forma, as taxas foram calculadas e foi realizada uma análise descritiva dos dados, que se encontra na Tabela 6.

O maior número de gestações aos 35 dias foi gerado com embriões provenientes de células do cordão umbilical (três gestações), porém, proporcionalmente aos embriões transferidos, a maior taxa de prenhez foi obtida com embriões de células do tecido adiposo (25%).

Tabela 5. Resultados das prenhez, abortos e nascimentos dos três tipos celulares distintos utilizados na TN.

Tipo celular	Nº de embriões reconstruídos transferidos	Nº de receptoras	35 dias de gestação (Nº e %)	45 dias de gestação	90 dias de gestação	120 dias de gestação	270 dias de gestação	Abortos ¹	Bezerros nascidos
Adiposa	4	4	1 (25)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	*	*	*
Amniótica	8	5	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0	1 (12,5)
Geléia de Wharton	15	12	3 (20)	2 (13,33)	2 (13,33)	0	0	3 (100)	0
<i>Total</i>	<i>27</i>	<i>21</i>	<i>5 (18,5)</i>	<i>4 (14,81)</i>	<i>4 (14,81)</i>	<i>2 (7,4)</i>	<i>1 (3,7)**</i>	<i>3 (60)**</i>	<i>1 (3,7)**</i>

* Até a conclusão do trabalho, a gestação encontrava-se aos 200 dias, sendo esses dados não disponíveis.

** Valores obtidos desconsiderando os dados provenientes das TN's com células adiposas.

¹ Porcentagem de abortos calculada em relação ao número de gestações aos 35 dias.

No caso das prenhez com células da geléia de Wharton, uma delas se tratava de gestação dupla (Figura 13), proveniente de transferência de dois embriões em uma receptora. No acompanhamento dessa gestação, com auxílio de ultrassonografia, aos 90 dias já havia dúvidas quanto à sobrevivência dos fetos, que estavam de difícil visualização. Já aos 116 dias, não foi possível visualizar quaisquer fetos e, embora o útero estivesse repleto de líquido, o seu tamanho não condizia com a idade gestacional. No dia 117 da gestação foi observado o aborto. A outra prenhez de células da geléia foi perdida por volta de 45 dias de gestação. Assim, mesmo obtendo-se o maior número de gestações aos 35 dias, todas elas foram perdidas no decorrer do tempo.



Figura 13. Gestação dupla obtida da transferência de dois embriões provenientes de TN com células da geléia de Wharton.

Uma prenhez foi obtida com células adiposas (25%), gestação essa que até a data da conclusão deste trabalho se mantinha e estava aos 200 dias.

E finalmente, uma prenhez foi obtida com embriões provenientes de células amnióticas. A gestação foi mantida normalmente até os 245 dias, quando uma produção exagerada de líquido placentário foi observada clinicamente por aumento anormal da cavidade abdominal (Figura 14).



Figura 14. Vista cranial (A) e caudal (B) de receptora com 270 dias de gestação de um animal clonado, apresentando hidropsia das membranas fetais.

O excesso de produção de líquido levou à compressão da cavidade torácica, dificultando a respiração da receptora, e ainda, levando ao emagrecimento da mesma. Desta forma, optou-se pela indução do parto aos 277 dias de gestação. A indução foi realizada por meio de administração intra-muscular de 2 mL de clorprostenol e 10 mL de dexametasona. Após aproximadamente 36 horas da indução, a receptora entrou em trabalho de parto com o rompimento dos sacos alantoideano e amniótico. Realizou-se a palpação vaginal para verificar a possibilidade de nascimento natural do

animal clonado, e verificou-se que o bezerro estava em apresentação posterior e posição inferior, caracterizando um caso indicado para cesariana.

A receptora foi posicionada em decúbito lateral direito para realização da secção cesariana para-mamária. Foi feita anestesia local com lidocaína 2%. Ao seccionar o útero, observou-se a presença de mecônio, o que caracteriza sofrimento fetal. A bezerra clonada foi retirada com vida do útero, apresentando movimentação de membros anteriores e posteriores ao ter o cordão umbilical pinçado para ser seccionado. Após a secção do cordão umbilical, a bezerra foi posicionada de cabeça para baixo para retirada de líquido que possivelmente teria sido aspirado. Uma grande quantidade de líquido foi retirada pelas narinas e pela boca, porém a obstrução mecânica do líquido que restou nas vias aéreas do animal impossibilitou sua respiração e o mesmo veio a óbito (Figura 15).



Figura 15. Animal clonado a partir de células do fluido amniótico. As setas indicam uma deformidade física do animal, a flexão das articulações metatarsofalangeanas.

Ao exame externo do animal, que pesou 58,5kg, foram evidenciadas as seguintes alterações: dentes não completamente enrijecidos, evidenciando imaturidade, leve espessamento de cordão umbilical e flexão bilateral das articulações metatarsofalangeanas (Figura 15).

No exame necroscópico, a abertura da cavidade torácica revelou efusão abundante, caracterizando um hidrotórax seroso (Figura 16).

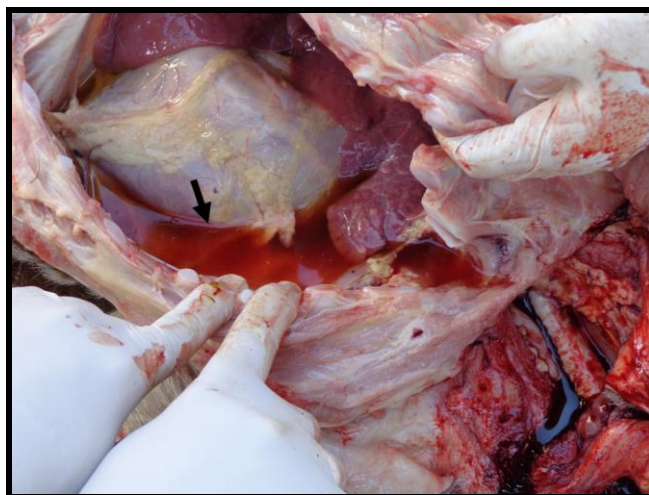


Figura 16. Presença de líquido de aspecto seroso dentro da cavidade torácica de bezerra clonada recém-nascida, caracterizando um hidrotórax seroso.

Constatou-se a presença de líquido de aspecto aerado proveniente de aspiração distribuído por toda traquéia (Figura 17B). Ao analisarem-se os pulmões, verificou-se, que o animal conseguiu respirar, pois havia ar dentro dos mesmos, porém, havia também a presença de líquido (Figura 17A).

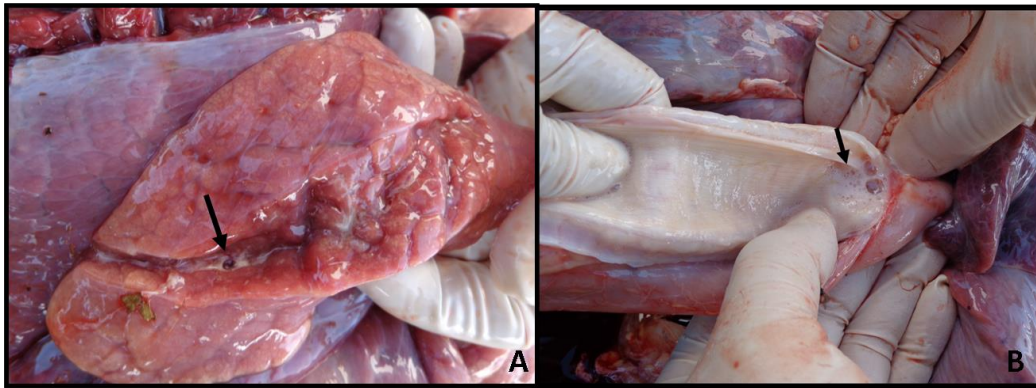


Figura 17. A) Extravasamento de líquido do interior do pulmão ao corte (seta). B) Secreção espumosa no interior da traquéia de bezerra clonada (seta), indicativo de edema pulmonar.

Já na cavidade abdominal, a única alteração evidente foi do fígado de tamanho aumentado, que se encontrava com a coloração amarelada, com deposição de gordura superficial e com bordos arredondados indicando o edema do órgão (Figura 18).

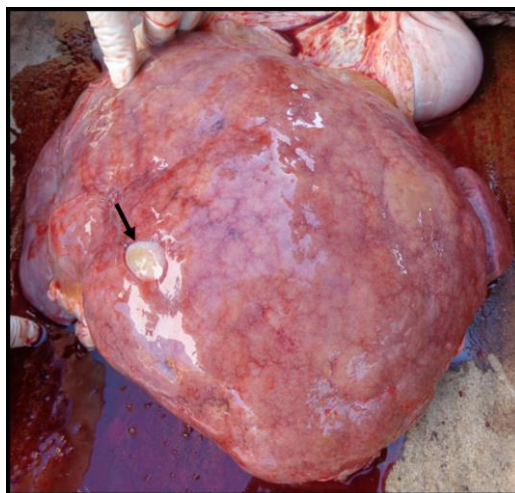


Figura 18. Fígado retirado de animal clonado, com coloração anormal, bordos arredondados, indicando edema do órgão e deposição de gordura na superfície (seta).

Aparentemente, a causa *mortis* da bezerra clonada foi insuficiência respiratória por aspiração de líquido amniótico.

A receptora necessitou de cuidados, como aplicação de solução fisiológica intravenosa como meio de compensar a grande perda de líquido que estava na placenta. E também apresentou retenção de placenta, exigindo acompanhamento com aplicação de antibióticos e massagens uterinas a fim de remover a placenta e secreções purulentas. Foi feita também a administração de cálcio subcutâneo para auxiliar nas contrações abdominais e expulsão da placenta. Após 10 dias de acompanhamento os pontos de sutura foram retirados e o útero do animal encontrava-se sem secreções ou placenta aderida.

7. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou ser possível obter líquido amniótico de fêmeas prenhas por meio de aspiração uterina guiada pelo ultrassom (AUGU) e recuperar células viáveis, cultivá-las e criopreservá-las com eficiência em meio específico adicionado de dimetilsulfóxido. Além disso, este trabalho demonstrou de maneira inédita ser possível isolar células do cordão umbilical e do tecido adiposo e estabelecer um banco dos três tipos celulares do mesmo animal. Ainda, foi possível verificar que as CFA, CGW e CTA produziram embriões por transferência nuclear com eficiência superior a outros tipos celulares citados na literatura.

O procedimento de transferência nuclear em bovinos, normalmente é realizado para multiplicação comercial de animais de alto valor genético. Geralmente, estes animais são velhos e os resultados da TN são mais baixos. Uma estratégia utilizada nestes casos para se obter células jovens, é produzir uma prenhez de TN e retirar o feto no quadragésimo dia de gestação para isolamento de fibroblastos. Porém, este procedimento é extremamente criticado por ser contrário as normas éticas para manipulação animal.

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a possibilidade de obtenção de células fetais diretamente do útero gravídico sem alterar o desenvolvimento normal da gestação. Desta forma, este trabalho provou ser viável o procedimento de AUGU, que pode ser praticada em casos de reclonagem de animais mais velhos.

As células do fluido amniótico têm sido utilizadas em humanos para diagnóstico pré-natal de doenças já há mais de 70 anos (Bydlowski et al., 2009) e o procedimento de amniocentese é feito como parte do tratamento de doenças como a Síndrome da

Transfusão Feto-Fetal (Benavides et al., 2012). Da mesma forma, neste estudo, buscou-se estabelecer a metodologia de isolamento de CFA por meio de amniocentese intravaginal guiada pelo ultrassom em fêmeas prenhes, uma vez que há poucos relatos na literatura (Garcia e Salaheddine, 1997; Kamimura et al., 1997).

Houve sucesso no procedimento de isolamento das células amnióticas de animais vivos neste estudo, porém deve-se adequar o período da prenhez, a quantidade de líquido a ser retirado e as condições assépticas do procedimento de coleta, sob risco de perda gestacional. Prenhez acima de 70 dias dificultaram a manipulação do útero gravídico durante a coleta e o posicionamento da agulha de aspiração no saco amniótico.

Dev e colaboradores (2012a; 2012b) realizaram o isolamento de células do fluido amniótico de úteros de bubalinos de abatedouro, espécie que mais se aproxima ao bovino com relato de isolamento e cultivo desse tipo celular, mas ainda assim não foi o isolamento *in vivo*. Em outras espécies, o isolamento das células do fluido amniótico procedeu-se em ovinos (Kaviani et al., 2001; Mauro et al., 2010), equinos (Lovati et al., 2011), suínos (Zheng et al., 2009) e caninos (Filioli Uranio et al., 2011). No caso dos ovinos, a coleta das células foi feita por meio do isolamento dos fetos de 60 a 80 dias por uma seção cesariana (Mauro et al., 2010); ou fetos de 71 a 90 dias por meio de laparotomia mediana (Kaviani et al., 2001). Já em equinos, a coleta do fluido amniótico foi realizada no momento do parto, quando cerca de 60 mL de líquido foram coletados diretamente do saco amniótico que se projetava da vulva antes da sua ruptura espontânea (Lovati et al., 2011). Finalmente, em caninos, a coleta procedeu-se de úteros com idade gestacional entre 25 a 40 dias, por meio de ovariectomia eletiva (Filioli Uranio et al., 2011).

Este estudo demonstrou que o meio Amniomax Complete II foi mais eficiente para o cultivo de CFA que o meio DMEM, por ser seletivo e por promover crescimento celular mais acelerado.

Neste trabalho, a utilização do meio DMEM adicionado de 10% de SFB promoveu um crescimento inicial das células, porém o mesmo sempre era interrompido, nunca gerando confluência celular. Talvez a adição de uma quantidade maior de SFB e outros suplementos seja essencial para o desenvolvimento das células amnióticas, que podem ser mais exigentes. Fato não observado para as células da geleia de Wharton e adiposas, que cresceram e confluíram com DMEM e 10% de SFB.

A maioria dos trabalhos com CFA de humanos (De Coppi et al., 2007; Benavides et al., 2012), búfalos (Dev et al., 2012a; 2012b) e ovinos (Kaviani et al., 2001; Mauro et al., 2010) utilizou um meio de cultivo de células amnióticas contendo MEM ou DMEM como base, suplementado com SFB numa proporção acima da utilizada neste estudo. Além disso, geralmente, outros suplementos como aminoácidos e vitaminas, além dos antibióticos, foram adicionados.

No estudo comparativo entre as substâncias crioprotetoras, verificou-se que apesar de não ter sido identificadas diferenças significativas entre as soluções contendo glicerol e DMSO, a maior porcentagem de células íntegras foi obtida quando foi utilizada a solução de proteção contendo o DMSO.

Ainda, este estudo provou que o abaixamento da temperatura sem curva automatizada é viável para a formação de um banco de células, por ser de baixo custo e de fácil estabelecimento em qualquer laboratório.

Miranda-Sarayo et al. (2012), utilizando protocolo semelhante ao atual estudo, confirmaram que as células amnióticas humanas não tiveram suas características

biológicas alteradas, tais como expressão de certos antígenos de superfície ou a não diferenciação espontânea em linhagens, pelo uso de DMSO e da redução progressiva da temperatura.

Os procedimentos de coleta das células da geleia de Wharton e, principalmente, das células adiposas mostraram-se de execução mais simples do que a coleta das células amnióticas e nenhum tipo de contaminação foi observado durante o cultivo desses tipos celulares. Apesar de muitos trabalhos isolarem as células da geleia de Wharton por meio de digestão enzimática, no presente trabalho foi utilizado o método de explante para isolamento celular, cultivando várias pequenas biópsias de tecido em placas. O mesmo método foi utilizado por Ishige e colaboradores (2009), trabalhando com cordão umbilical humano. Estes autores constataram que o método de explante foi superior ao método enzimático para a eficiência de isolamento das MSC do cordão umbilical.

Outro detalhe importante a ser avaliado antes do procedimento de clonagem é a determinação da integridade nuclear das células doadoras, pois danos à molécula de DNA podem levar ao comprometimento do desenvolvimento embrionário. Assim, neste estudo, ao se utilizar células em primeira passagem para a realização da metodologia de TUNEL, verificou-se que 100% de todos os tipos celulares encontravam-se com o DNA íntegro. Essas células passaram por processo de congelação e descongelação, procedimentos que mesmo agressivos não foram suficientes para causar quaisquer danos às células. Em espermatozóides eqüinos, mesmo após sofrerem diversos procedimentos agressivos, tais como congelação, descongelação, centrifugação e liofilização, o índice de fragmentação do DNA, não ultrapassou 3%. Porém, a metodologia de análise da integridade de DNA no estudo

citado foi pelo corante Acridine Orange (Choi et al., 2011), que embora seja um teste de fácil performance, apresenta resultados questionados quando sua leitura é feita em microscopia de epifluorescência (Martins et al., 2007).

A exposição à radiação ultravioleta da luz solar é uma fonte de danos ao DNA celular e pode ser uma possível causa das altas taxas de aborto, assim como das anormalidades observadas em bezerros clonados (Kato et al., 2000). Desta forma, ao utilizar-se tipos celulares que não são expostos à luz solar, como as CFA, CGW e CTA, como doadores de núcleo na TN, minimizam-se os danos ao DNA celular e, conseqüentemente, aumentam-se as possibilidades de nascimento de produtos vivos e saudáveis.

A comparação morfológica dos tipos celulares foi realizada por visualização direta em microscópio invertido e também por meio de microscopia eletrônica de varredura, que revelou a falta de padrão específico de crescimento celular em garrafa das CFA e CGW. As CTA mostraram com o passar do tempo (P8), um padrão fusiforme de crescimento celular.

Nenhum dos tipos celulares utilizados neste experimento para a produção de embriões bovinos por TN foi relatado na literatura, tratando-se, portanto, de um trabalho inédito.

O uso das células-tronco mesenquimais do fluido amniótico para o tratamento de anomalias congênitas em humanos já foi validado experimentalmente (Kunisaki et al., 2007), entretanto o uso desse tipo de célula na reprodução de animais domésticos, especialmente na clonagem, tem sido pouco relatado. O único trabalho com TN utilizando CFA em espécies domésticas é o de Zheng et al. (2009), na espécie suína, comparando-as com outros tipos celulares somáticos diferenciados, tais como

fibroblastos. Os autores perceberam que a taxa de produção de blastocistos utilizando as CFA foi significativamente superior comparada aos outros tipos celulares, produzindo produtos clonados somente dos tipos celulares considerados células-tronco (fluido amniótico e neurais). Zheng et al. (2009) concluíram, então, que o estado indiferenciado da célula doadora aumenta a eficiência da clonagem na espécie suína.

Outra vantagem das células embrionárias e fetais é o fato de possuírem os telomêros mais longos. Quando as células se dividem, os telomêros vão ficando mais curtos, tornando mais fácil a fusão entre as extremidades desses cromossomos, levando a translocações e à instabilidade cromossomal (Mastromonaco et al., 2006).

Acredita-se que as células fetais tenham menos danos genéticos e maior habilidade proliferativa do que as células adultas, portanto, elas têm sido preferidas como doadoras de núcleo para clonagem (Miyoshi et al., 2003), que é o caso de dois dos tipos celulares utilizados, as células amnióticas e do cordão umbilical.

Neste trabalho não houve alteração na eficiência da técnica pelo tipo de célula, porém quando foi observada a produção de blastocistos para as CGW, houve um aumento de aproximadamente 17%, quando comparado aos outros tipos celulares, mas como os desvios padrão foram altos, essa diferença não foi significativa.

Observou-se um padrão tardio de produção embrionária para as CTA e CGW, de $19,64 \pm 24,31\%$ e $10,00 \pm 9,34\%$, respectivamente. E nenhum embrião produzido em D8 quando da utilização de CFA.

Em relação às taxas de eletrofusão foi observada grande variação entre elas ($50,07 \pm 10,64\%$ para CTA; $85,89 \pm 9,93\%$ para CFA e $69,64 \pm 11,72\%$ para CGW), fato que pode ser explicada pelo tamanho das células. Através de observações durante os

procedimentos de TN, constatou-se um maior tamanho das células do fluido amniótico e da geleia de Wharton quando comparadas às células do tecido adiposo, observações que condizem com os resultados encontrados. Esse maior tamanho celular possivelmente contribuiu para um contato apropriado entre a membrana da célula doadora, a zona pelúcida e a membrana citoplasmática do ovócito, além de facilitar a visualização da célula no momento da eletrofusão, tornando o procedimento mais rápido e eficiente. Estes resultados corroboram os achados de Galli et al. (2002), que relatam que as células devem estar intactas e de tamanho médio a grande, para que as membranas sejam fusionadas. Ainda Lagutina et al. (2007) afirmam que a eficiência da fusão é também influenciada pela qualidade das culturas doadoras de células. Contrariamente, Inoue et al. (2003) afirmam saber de forma empírica que o menor tamanho das células doadoras muitas vezes provém melhores desenvolvimentos de clones do que células maiores.

As taxas de clivagem de todos os tratamentos ficaram em torno dos 40%, que é considerada baixa. Uma possível explicação seja o fato de que após a observação da quantidade de estruturas fusionadas, algumas estruturas tenham se degenerado e estas não foram retiradas posteriormente. Estas estruturas não se desenvolvem nem passam por divisão celular, e não foram retiradas do meio. Taxas de clivagem semelhantes às observadas por este estudo foram obtidas em trabalho de Hosseini et al. (2008), com a espécie ovina, que permaneceram entre 37 e 43%.

Inoue et al. (2003) trabalhando com clonagem de camundongos, mostraram que o efeito do tipo celular na clonagem já pôde ser verificado na taxa de clivagem. O mesmo não foi observado neste trabalho, onde as taxas de clivagem foram semelhantes para os três tipos celulares. Porém observou-se superioridade numérica

na produção de blastocistos quando utilizou-se as CGW. Inoue et al. (2003) atribuíram as taxas de clivagem diferentes entre seus tipos celulares a maior proporção de células em G0/G1 em um tipo celular do que outro. Isto também pode ter ocorrido no presente estudo por não ter sido usado a soro-privação como método de sincronização das células no estágio G0/G1 do ciclo celular.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura utiliza a soro-privação para essa sincronização, alegando gerar uma maior porcentagem de células síncronas disponíveis quando comparado somente com confluência celular. Assim, talvez células em outras fases do ciclo celular possam ter sido utilizadas e não resultaram em divisão celular. O núcleo da célula doadora em fase G0 necessita dos altos níveis de MPF (fator promotor de metáfase/maturação) presente no citoplasma do ovócito receptor em metáfase II, para que haja a correta reprogramação nuclear antes das divisões celulares. Em camundongos, a prolongada exposição do núcleo em citoplasma rico em fatores promotores de metáfase causa uma condensação de cromossomos persistente e pode facilitar alterações nucleares que são essenciais para o desenvolvimento (Liu et al., 2001).

No atual estudo foram obtidos embriões e gestações com o uso de células que não passaram por soro-privação, indicando que este tratamento não é essencial para o sucesso da TN. Mas os resultados com relação à utilização de células com e sem soro-privação ainda é muito controversa. A comparação do efeito da utilização ou não da soro-privação foi realizada em trabalho de Kubota et al. (2000), com células em P5. Os autores demonstraram que o tratamento com soro-privação não melhorou o desenvolvimento *in vitro* dos embriões reconstruídos, corroborando com os achados

de Liu et al. (2001). Porém, no trabalho de Kubota et al. (2000) não foi estabelecida nenhuma prenhez de células que não passaram por soro-privação.

Robertson (1997) sugeriu que uma sequência adicional de TN permitiria uma segunda rodada de reprogramação com o objetivo de evitar a alta incidência de perdas gestacionais e anormalidade neonatais reportadas em animais clonados. Isso para explicar o uso de células provenientes da chamada reclonagem, procedimento no qual as células doadoras de núcleo são coletadas de um animal clonado. Entretanto, em trabalho de Hill et al. (2000), que comparou TN com células adultas (animal de 21 anos de idade) e células de um feto de 40 dias de idade clonado desse mesmo animal, não se observou diferença nas taxas de blastocistos. Os resultados do atual estudo foram tão bons quanto os resultados da reclonagem, indicando que talvez embriões possam ser produzidos com igual ou superior eficiência.

Ainda, as informações deste estudo comprovam ser possível promover prenhez e recuperar células do fluido amniótico sem danificar o feto. Procedimento que pode ser realizado para uso da estratégia da reclonagem e recuperação de células do feto clonado sem a necessidade de fazer a retirada do feto cirurgicamente.

Outro fato relevante a ser considerado é a diminuição na produção de blastocistos com a utilização de células em passagens tardias, devido a danos genéticos que podem ocorrer durante o cultivo *in vitro* das células doadoras antes da TN (Miyoshi et al., 2003).

Neste estudo houve a vantagem de utilizar células em passagens iniciais (até P9), reduzindo a ocorrência de danos genéticos, e conseqüente diminuição das taxas avaliadas. Mastromonaco et al. (2006), demonstraram que houve diminuição nas taxas

de blastocistos quando células na passagem P30 foram utilizadas em comparação com P5 a P10.

Um trabalho utilizando e comparando uma grande quantidade de tipos celulares de bovinos foi desenvolvido por Kato e colaboradores (2000). As células doadoras de núcleo foram desde células reprodutivas até células do fígado e rins, de animais adultos, fetos e recém-nascidos de machos e fêmeas. Os maiores resultados de produção de blastocistos foram de células provenientes de rim de feto fêmea (66,66%) e fígado de macho adulto (64,15%). Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para as CGW. Não se sabe a característica em comum desses três tipos celulares que fazem com que sejam os melhores na TN neste trabalho e de Kato et al. (2000), mas pode-se especular que haja uma influência individual. Fato semelhante foi observado por Fu et al. (2008), no qual diferenças significativas foram observadas nas taxas de produção de blastocistos entre quatro animais diferentes. No experimento de Kato e colaboradores (2000), a hipótese de que células mais diferenciadas comportam-se de uma maneira inferior quanto à produção de blastocistos não se sustentou.

Um trabalho inovador foi realizado por Liu et al. (2010) utilizando células somáticas isoladas e cultivadas a partir de sêmen fresco de bovinos, na busca de novos tipos celulares para o procedimento de TN. A melhor taxa de produção de blastocistos ficou em 40,27%, semelhante aos resultados deste estudo para as CFA e CTA, porém no experimento de Liu et al. (2010) foi utilizado o sistema Piezo drill para a introdução das células no citoplasma recipiente. Entretanto, para sêmen congelado, nenhum blastocisto foi obtido, somente estruturas clivadas, isto porque a maioria das células estão "achatadas" e suas membranas estão rígidas, dificultando sua utilização no sistema Piezo, no qual elas necessitam ter o núcleo exposto.

Em trabalho de Wells et al. (1999), que utilizaram células da granulosa murais para o procedimento de TN, grande taxa de produção de blastocistos foi demonstrada (51,1%, 282 blastocisto/552 estruturas cultivadas). Os autores alegam que embora as células da granulosa murais tenham uma função especializada, elas não são terminalmente diferenciadas. Além dos bons resultados em taxa de blastocistos, dos embriões transferidos, 10% nasceram. Já em experimento realizado por Galli et al. (2002) utilizando células da granulosa bovinas, a taxa de blastocistos em relação às estruturas fusionadas foi de 39,5%.

Em experimento de Zakhartchenko et al. (2001), trabalhando com diversos tipos celulares, transfectados e não-transfectados, provenientes de reclonagem (fetal ou nascido) ou origem fetal, os resultados obtidos foram bons, superando os encontrados por este presente estudo. No trabalho citado, foram atingidos 65% de blastocistos (em relação aos clivados) com fibroblastos fetais não transfectados. Convém ressaltar que o método de ativação foi diferente, neste caso sendo realizado com incubação em meio contendo etanol seguido por cultivo com cicloheximida e citocalasina B, e com troca do meio de cultivo no dia 5, para um meio suplementado com 10% de soro de vaca em estro (ECS).

Neste trabalho o único tipo celular que apresentou perda gestacional foram as CGW. O maior número de embriões transferidos (15) foi com esse tipo celular, das quais foram obtidas três prenhezess e todas foram perdidas. O fato de uma dessas prenhezess ser dupla fez com que ela se tornasse mais suscetível ao aborto.

Uma gestação proveniente de TN com células adiposas, representando 25% do total de embriões transferidos, encontra-se aos 200 dias, e progredindo normalmente até o momento.

A eficiência geral da técnica quando utilizadas as CFA foi de 12,5%, maior que a descrita na literatura de 0 a 5% (Heyman et al., 2002). Entretanto, a bezerra nasceu viva e morreu logo após o nascimento.

A bezerra da raça Guzerá nasceu com 58,5 kg, apresentando, claramente, uma das características da síndrome do bezerro grande - LOS (*large offspring syndrome*). Segundo Young et al. (1998), o aparecimento dessa síndrome em bovinos e ovinos dá-se após a exposição a ambientes incomuns tanto *in vivo* como *in vitro*. As condições *in vitro* associadas com o desenvolvimento da síndrome são a exposição ao co-cultivo com células e ao soro, ambos presentes no meio de cultivo. O SFB é uma mistura complexa e indefinida contendo hormônios, fatores de crescimento, vitaminas e numerosos outros fatores e sua adição ao meio, ou o uso do co-cultivo alteram o meio quimicamente definido para indefinido (Campbell et al., 2007).

A LOS é usada para descrever um número de malformações e doenças, o elevado peso ao nascimento é apenas uma dessas manifestações. De acordo com Vajta e Gjerris (2006), outros problemas já foram detectados em camundongos, bovinos e ovinos, tais como anormalidades placentárias, hipóxia, falha respiratória, falta de vigor pós-natal, malformações no fígado e cérebro e infecções bacterianas e virais.

Como consequência da LOS, a reduzida capacidade de sobrevivência neonatal é devido em parte à elevada incidência de distocia nesses casos, afirmam Garry et al. (1996). Os mesmos autores observaram diferenças de peso ao nascimento entre animais clonados de células embrionárias do mesmo embrião, sugerindo que diversos fatores influenciam sobre o padrão de crescimento dos fetos geneticamente idênticos.

Campbell et al. (2007) afirmam que as alterações características da LOS são induzidas durante os períodos críticos do desenvolvimento pré-implantacional como

resultado de um inadequado sistema de produção *in vitro* dos embriões, como já mencionado, e/ou como resultado da reprogramação anormal do núcleo doador durante os procedimentos de clonagem.

Young et al. (2001) citaram que ovinos que apresentaram LOS tinham níveis significativamente alterados do fator de crescimento fetal IGF2R e alterações simultâneas no *status* de metilação da parte regulatória desse gene. Segundo os autores, o IGF2R é um gene *imprinted* e alterações na sua expressão fetal poderiam ser devido a alterações no seu padrão de metilação induzidas por altos níveis de soro durante o desenvolvimento *in vitro*.

Estudos examinando o *status* de metilação dos genes *imprinted* em embriões, fetos e placentas de murinos e ovinos foram consistentes com a hipótese que a desregulação epigenética da expressão dos genes *imprinted* é um fator chave ligado à ocorrência da LOS (Farin et al., 2006). Está claro que a desregulação epigenética causada pela TN tem o potencial de afetar um grande número de genes regulatórios controlados pelo *imprinting* (Farin et al., 2006).

A dificuldade respiratória observada logo após o nascimento da bezerra deste experimento pode estar associada à LOS. Outra hipótese é a de que a inadequada ventilação pode ter sido causada por uma deficiência de surfactante, resultante ou da produção inadequada pelas células alveolares tipo II, ou da diminuição da sua concentração devido à diluição pelo fluido amniótico em excesso (Hill et al., 1999), que foi aspirado pela bezerra, constatado na necropsia.

Peso ao nascimento semelhantes aos deste estudo foram encontrados por Hill et al. (1999), que chegaram a 58,6 kg. Este animal apresentou flexão bilateral dos boletos, mesma deformidade observada na bezerra do presente estudo. Já em

trabalho de Garry et al. (1996) o maior peso ao nascimento, dentre 40 bezerros clonados, foi de 67,3 kg, pesando então, 8,8 kg a mais que o atual estudo. Esse animal também apresentou flexão severa bilateral dos membros anteriores, que foi corrigida por meio de tenotomia bilateral do tendão flexor superficial. Outros quatro animais também apresentaram a mesma deformidade, porém em menor grau de severidade. Uma possível explicação para as deformidades de membros é a de que quando os fetos são grandes, por consequência, são “apertados” no útero (Garry et al., 1996). Entretanto, um bezerro clone que pesou 72,5kg (160 libras), não apresentou quaisquer anormalidades anatômicas (Keefer et al., 1994), mas ainda nesse trabalho, de quatro animais nascidos, dois apresentaram deformidades de flexão dos membros.

A bezerra nascida neste estudo também apresentou alterações hepáticas, tais como parênquima com coloração amarelada e bordos irregulares. Esses achados corroboram com Santos et al. (2010), em que alterações hepáticas estavam presentes em 46,1% dos animais. Segundo esses autores, fígados com aspecto amarelado e acastanhado sugerem um quadro de degeneração hepática, que deve ser constatada microscopicamente. Hill et al. (1999) também encontraram alteração na coloração do fígado de um clone que morreu aos 4 dias de vida, que se apresentava de coloração laranja pálido (clone transgênico).

Garry et al. (1996) especulam que a origem dos problemas neonatais dos bezerros clonados está em distúrbios na regulação energética feto-placenta que pode ser resultado de alterações no ambiente embrionário inicial durante os procedimentos da clonagem. Da mesma forma, Cibelli et al. (1998) atribuíram os problemas de desenvolvimento exibidos pelos animais que não sobreviveram em seu trabalho, à placentação anormal, e ainda, afirma que permanece para ser elucidado se a origem

dessas patologias está ligada ao procedimento de TN ou as condições de cultivo às quais os embriões são submetidos na sua primeira semana de desenvolvimento.

Finalmente, percebeu-se neste trabalho, que as patologias associadas à vida pós-natal e à mortalidade durante o desenvolvimento embrionário e logo após o nascimento de animais clonados devem-se não somente à técnica de produção desses animais, através de TN, mas também às condições de cultivo inicial, na primeira semana de vida do embrião em laboratório. Esses fatores da técnica e de cultivo podem ser decisivos no desenvolvimento embrionário e fetal e no nascimento e sobrevivência normais de animais clonados.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

É possível isolar, cultivar e criopreservar com eficiência células do fluido amniótico, da geleia de Wharton e do tecido adiposo de bovinos vivos sem prejudicá-los, sendo uma opção para recuperar células para a reclonagem.

Neste estudo, foi possível produzir com eficiência embriões através de TN a partir de três tipos celulares. Apesar de se ter realizado a transferência desses embriões para receptoras, um estudo *in vivo* com maior número de receptoras e embriões transferidos faz-se necessário para se obter resultados mais conclusivos sobre a influência desses tipos celulares na produção de animais vivos e saudáveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulrazzak, H., Moschidou, D., Jones, G., Guillot, P.V., 2010. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of the Royal Society Interface* 7, S689-S706.

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., 2007. 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* 7, 1-14.

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palácios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overström, E.W., Echelard, Y., 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17, 456-461.

Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S., 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8, 301-316.

Benavides, O.M., Petsche, J.J., Moise Jr., Johnson, A., Jacot, J.G., 2012. Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A* 18, 1123-1131.

Bydlowski, S.P., Debes, A.A., Duarte, S.A., Janz, F.L., Cavaglieri, R.C., Maselli, L.M.F., 2009. Células-tronco do líquido amniótico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31, 45-52.

Campbell, K.H.S., 1999. Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10, 245-252.

Campbell, K.H.S., Ritchie, W.A., Wilmut, I., 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biology of Reproduction* 49, 933-942.

Campbell, K.H.S., Fisher, P., Chen, W.C., Choi, I., Kelly, R.D.W., Lee, J.-H., Xhu, J., 2007. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology* 68S, S214-S231.

Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., Troyer, D., 2006. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 1-13.

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., 2011. Enucleation after fusion and activation enhances the development of reconstructed bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 129, 162-170.

Choi, Y.H., Varner, D.D., Love, C.C., Hartman, D.L., Hinrichs, K., 2011. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* 142, 529-538.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León F.A., Robl, J.M., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.

Corradetti, B., Lange-Consiglio, A., Barucca, M., Cremonesi, F., Bizzar, D., 2011. Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intervascular and perivascular equine umbilical cord matrix. *Cell Proliferation* 44, 330-342.

Cremonesi, F., Corradetti, B., Consiglio, A.L., 2011. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Theriogenology* 75, 1400-1415.

Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., Reik, W., 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 98, 13734-13738.

De Coppi, P., Bartsch Jr, G., Siddiqui, M.M., Xu, T., Santos, C.C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A.C., Snyder, E.Y., Yoo, J.J., Furth, M.E., Soker, S., Atala, A., 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 25, 100-106.

De Mattos Carvalho, A., Alves, A.L.G., Golim, M.A., Moroz, A., Hussni, C.A., Oliveira, P.G.G., Deffune, E., 2009. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 132, 303-306.

Dev, K., Gautam, S.K., Giri, S.K., Kumar, A., Yadav, A., Verma, V., Kumar, P., Singh, B., 2012a. Isolation, culturing and characterization of feeder-independent amniotic fluid stem cells in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science* 93, 743-748.

Dev, K., Giri, S.K., Kumar, A., Yadav, A., Singh, B., Gautam, S.K., 2012b. Derivation, characterization and differentiation of buffalo (*Bubalus bubalis*) amniotic fluid derived stem cells. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 704-711.

D'Ipollito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., Howard, G.A., 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* 14, 1115-1122.

Fairburn, H.R., Young, L.E., Hendrich, B.D., 2002. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? *Current Biology* 12, R68-R70.

Farin, P.W., Piedrahita, J.A., Farin, C.E., 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65, 178-191.

Fauza, D., 2004. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 18 877-891.

Filioli Uranio, M., Valentini, L., Lange-Consiglio, A., Caira, M., Guaricci, A.C., L'Abbate, A., Catacchio, C.R., Ventura, M., Cremonesi, F., Dell'Aquila, M.E., 2011. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Molecular Reproduction & Development* 78, 361-373.

Fu, J., Guan, P., Zhao, L., Li, H., Huang, S., Zeng, F., Zeng, Y., 2008. Effects of donor cells on in vitro development of cloned bovine embryos. *Journal of Genetics and Genomics* 35,273-278.

Galli, C., Lagutina, I., Vassiliev, I., Duchi, R., Lazzari, G., 2002. Comparison of microinjection (Piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning and Stem Cells* 4, 189-196.

Garcia, A., Salaheddine, M., 1997. Bovine ultrasound-guided transvaginal amniocentesis. *Theriogenology* 47, 1003-1008.

Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P., Odde, K.G., 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45, 141-152.

Gómez, M.C., Pope, C.E., Dresser, B.L., 2006. Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology* 66, 72-81.

Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X., Renard, J.P., 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction* 66, 6-13.

Hill, J.R., Roussel, A.J., Cibelli, J.B., Edwards, J.F., Hooper, N.L., Miller, M.W., Thompson, J.A., Looney, C.R., Westhusin, M.E., Rob, J.M., Stice, S.L., 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51, 1451-1465.

Hill, J.R., Winger, Q.A., Long, C.R., Looney, C.R., Thompson, J.A., Westhusin, M.E., 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology of Reproduction* 62, 1135-1140.

Hiiragi, T., Solter, D., 2005. Reprogramming is essential in nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development* 70, 417-421.

Hochedlinger, L., Jaenisch, R., 2002., Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 415, 1035-1038.

Hosseini, S.M., Moulavi, F., Foruzanfar, M., Hajian, M., Abedi, P., Rezazade-Valojerdi, M., Parivard, K., Shahverdi, A.H., Nasr-Esfahani, M.H., 2008. Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning. *Small Ruminant Research* 78, 162-168.

Iguma, L.M., 2005. 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. Tese de doutorado. Brasília-DF.

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

Ishige, I., Nagamura-Inoue, T., Honda, M.J., Harnprasopwat, R., Kido, M., Sugimoto, M., Nakauchi, H., Tojo, A., 2009. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *International Journal of Hematology* 90, 261-269.

Jaenisch, R., Eggan, K., Humpherys, D., Rideout, W., Hochedlinger, K., 2002. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells* 4, 389-396.

Jasencakova, Z., Soppe, W.J.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M., Schubert, I., 2003. Histone modifications in Arabidopsis – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *The Plant Journal* 33, 471-480.

Kamimura, S., Nishiyama, N., Ookutsu, S., Goto, K., Hamana, K., 1997. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology* 47, 1563-1569.

Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.O., Tukun, A., Uckan, D., Can, A., 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 25, 319-331.

Kato, Y., Tani, T., Tsunoda, Y., 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 120, 231-237.

Kaviani, A., Perry, T.E., Dzakovic, A., Jennings, R.W., Ziegler, M.M., Fauza, D.O., 2001. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery* 36, 1662-1665.

Keefer, C.L., 2004. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Animal Reproduction Science* 82-83, 5-12.

Keefer, C.L., Stice, S.L., Matthews, D.L., 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biology of Reproduction* 50, 935-939.

Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., Yang, X., 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 990-995.

Kunisaki, S.M., Armant, M., Kao, G.S., Stevenson, K., Kim, H., Fauza, D.O., 2007. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. *Journal of Pediatric Surgery* 42, 974-980.

Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., Galli, C., 2007. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* 67, 90-98.

Lamberson, W.R., 1994. Production of genetically identical swine: uses for families with reduced phenotypic variation. *Theriogenology* 41, 453-460.

Liu, L., Shin, T., Pryor, J.H., Kraemer, D., Westhusin, M., 2001. Regenerated bovine fetal fibroblasts support high blastocyst development following nuclear transfer. *Cloning* 3, 51-58.

Liu, J., Westhusin, M., Long, C., Johnson, G., Burghardt, R., Kraemer, D., 2010. Embryo production and possible species preservation by nuclear transfer of somatic cells isolated from bovine semen. *Theriogenology* 74, 1629-1635.

Lovati, A.B., Corradetti, B., Consiglio, A.L., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D., Cremonesi, F., 2011. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Veterinary Research Communications* 35, 103-121.

Lu, F., Shi, D., Wei, J., Yang, S., Wei, Y., 2005. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology* 64, 1309-1319.

Martins, C.F., Dode, M.N., B ao, S.N., Rumpf, R., 2007. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genetics and Molecular Research* 6, 94-104.

Mastromonaco, G.F., Perrault, S.D., Betts, D.H., King, W.A., 2006. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. *BMC Developmental Biology* 6, 1-13.

Mauro, A., Turriani, M., Ioannoni, A., Russo, V., Martelli, A., Di Giacinto, O., Nardinocchi, D., Berardinelli, P., 2010. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research Communications* 34, S25–S28.

Melo, E.O., Canavessi, A.M.O., Franco, M.M., Rumpf, R., 2007. Animal transgenesis: state of the art and applications. *Journal of Applied Genetics* 48, 47-61.

Miki, T., Strom, S.C., 2006. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cells Reviews* 2, 133-141.

Miranda-Sayago, J.M., Fernandez-Arcas, N., Benito, C., Reyes-Engel, A., Herrero, J.R., Alonso, A., 2012. Evaluation of a low cost cryopreservation system on the biology of human amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. *Criobiology* 64, 160-166.

Miyoshi, K., Rzucidlo, S.J., Pratt, S.L., Stice, S.L., 2003. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biology of Reproduction* 68, 1079-1086.

Niemann, H., Tian, X.C., King, W.A., Lee., R.S.F., 2008. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* 135, 151-163.

Niemann, H., Lucas-Hahn, A., 2012. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 2-10.

Oback B, Wells D., 2002. Practical aspects of donor cell selection for nuclear cloning. *Cloning and Stem Cells* 4, 169-174.

Petters, R.M., Alexander, C.A., Wells, K.D., Collins, E.B., Sommer, J.R., Blanton, M.R., Rojas, G., Hao, Y., Flowers, W.L., Banin, E., Cideciyan, A.V., Jacobson, S.G., Wong, F., 1997. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nature Biotechnology* 15, 965-970.

Pittenger, 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., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

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

Reik, W., Dean, W., 2001. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* 22, 2838-2843.

Robertson, D., 1997. "Gene," another landmark in farmyard cloning. *Nature Biotechnology* 15, 833.

Rodriguez, A.-M., Elabd, Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E.-Z., Dani, C., Ailhaud, G., 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315, 255–263.

Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, Ez-Z., Ailhaud, G., Dani, C., 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125-128.

Santos, C.R., Grandi, F., Miglino, M.A., Meirelles, F.V., Maiorka, P.C., 2010. Patologia de neonatos bovinos originados por meio da técnica de transferência nuclear de células somáticas – clonagem. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 47, 447-453.

Sasaki, H., Matsui, Y., 2008. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics* 9, 129-140.

Shi, W., Zakhartchenko, V., Wolf, W., 2003. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 71, 91-113.

Siegel, N., Rosner, M., Hanneder, M., Valli, A., Hengstschläger, M., 2007. Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. *Stem Cells Reviews* 3, 256-264.

Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Strem, B.M., Hicok, K.C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R.E., Fraser, J.K., Hedrick, M.H., 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine* 54, 132-141.

Troyer, D.L., Weiss, M.L., 2008. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26, 591-599.

Vajta, G., Gjerris, M., 2006. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Animal Reproduction Science* 92, 211-230.

Vallée, M., Côté, J.-F., Fradette, J., 2009. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathologie Biologie* 57, 309-317.

Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwagerl, C., Eckstein, V., Ansorge, W., Ho, A.D., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology* 33, 1402-1416.

Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R., 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.

Wang, Y.S., Xiong, X.R., An, Z.X., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S., Zhang, T., 2011. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 75, 819-825.

Wani, N.A., Wernery, U., Hassan, F.A.H., Wernery, R., Skidmore, J.A., 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 82, 373-379.

Wells, D.N., Misica, P.M., Tervit, H.R., 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction* 60, 996-1005.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

Wolf, E., Zakhartchenko, V., Brem, G., 1998. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *Journal of Biotechnology* 65, 99-110.

Young, L.E., Sinclair, K.D., Wilmut, I., 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* 3, 155-163.

Young, L.E., Fernandes, K., McEvoy, T.G., Butterwith, S.C., Gutierrez, C.G., Carolan, C., Broadbent, P.J., Robinson, J.J., Wilmut, I., Sinclair, K.D., 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics* 27, 153-154.

Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Scherthaner, W., Stojkovic, M., Reichenbach, H.D., Mueller, S., Steinborn, R., Mueller, M., Wenigerkind, H., PELLE, K., Wolf, E., Brem, G., 1999. Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 52, 421-426.

Zakhartchenko, V., Mueller, S., Alberio, R., Scherthaner, W., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., Wanke, R.D., Lassnig, C., Mueller, M., Wolf, E., Brem, G., 2001. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Molecular Reproduction and Development* 60, 362-369.

Zheng, Y.M., Zhao, H.Y., Zhao, X.E., Quan, F.S., Hua, S., He, X.Y., Liu, J., He, X.N., Lin, H., 2009. Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived stem cells transfected with enhanced green fluorescence protein gene. *Reproduction* 137 793-801.

Zhou, H., Liu, C., Wang, W., 2007. Heterospecific nuclear-transferred embryos derived from equine fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 243-247.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 7, 211-228.