

CLONAGEM ANIMAL POR TRANSFERENCIA NUCLEAR EM BOVINOS

OLIVEIRA, Bruno Inácio Correa

Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva

ARNONE, Bianca

Doutora em Cirurgia Veterinária, Docente da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva

RESUMO

A fim de multiplicar animais de alto valor zootécnico, produzir animais transgênicos, combater a extinção e produção de células para fins biotecnológicos a biotécnica de clonagem por transferência nuclear em animais domésticos cresceu de maneira surpreendente desde a clonagem da ovelha Dolly. Nos dias atuais, a procura pela clonagem em bovinos esta crescendo a cada dia, pelo motivo de que proprietários buscam manter no seu rebanho animais de alto valor zootécnico. Existem muitas técnicas utilizadas para chegar a este fim, sendo elas utilizadoras de diferentes origens do embrião (produção *in vitro*, oriundos de células embrionárias, células somáticas fetais, ou células somáticas adultas), que por fim não podem garantir o sucesso do procedimento, pelos entraves que estão sujeitos em meio de um erro na técnica, na transferência ou pós transferência e até mesmo após o nascimento.

PALAVRAS-CHAVE: Clonagem, Dolly, Bovinos, técnicas, sucesso e entraves.

ABSTRACT

In order to multiply high-value livestock animals, producing transgenic animals, fight extinction and cell production for the biotech biotecnological purposes of cloning by nuclear transfer in livestock has grown dramatically since the cloning of Dolly the sheep. Nowadays, the demand for cloning in cattle is growing every day, for the reason that owners seek to retain in its herd animals with high zootechnical value. There are many techniques used to reach this end, they are users of different backgrounds of the embryo (*in vitro* production, derived from embryonic cells, fetal somatic cells, or adult somatic cells), which ultimately can not guarantee the success of the procedure, the barriers which are subject in the middle of an error in the art, transfer or post transfer, even after birth.

KEYWORDS: Cloning, Dolly, Cattle, techniques, success and obstacles.

1. INTRODUÇÃO



Buscando conhecer os aspectos fisiológicos e embrionários envolvidos na reprodução, bem como obter descendentes de animais geneticamente valiosos, muitos pesquisadores já estudaram a utilização de um conjunto de biotécnicas como ferramentas para a realização de tais objetivos. Seguindo esta temática, biotécnicas de última geração foram desenvolvidas, em especial, a transferência nuclear (TN) ou clonagem (PEREIRA & FREITAS, 2009).

A palavra clone vem do grego “*klôn*” e tem por significado “broto”. Inicialmente ela foi assim definida para representar as técnicas assexuadas de enxertia e brotamento para a multiplicação de plantas, passando em seguida a ter outro significado com o aprimoramento das técnicas de manipulação de embriões. Em animais, a clonagem pode ser definida como a produção de indivíduos geneticamente idênticos (HEYMAN & RENARD, 1996; TRECENTI & ZAPPA, 2013). A transferência nuclear consiste na fusão de uma célula diploide (embrionária fetal ou adulta) do animal a ser clonado com um oócito enucleado (MELLO, 2003).

1.1 HISTÓRICO DA CLONAGEM POR TRANSFERENCIA NUCLEAR

Em 1997, Keith Campbell et. al., relataram o nascimento da ovelha Dolly, sendo ela o primeiro clone produzido a partir de um núcleo de células somáticas de um animal adulto. Este resultado expandiu o interesse não apenas para multiplicar animais de alto valor, mais principalmente para produção de animais transgênicos, preservação de animais em vias de extinção e geração de células e tecidos para fins biomédicinas (GONÇALVES et. al., 2008).

No Brasil, foram conseguidos clones bovinos a partir de células embrionárias, fetais e adultas. Em março de 2001, em Brasília, DF nasceu o primeiro clone a partir de célula embrionária, a Vitória. No dia 27 de abril de 2002, em Monte-Mor – SP, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada jovem, o Marcolino da USP, o qual apresentou desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais. Em julho de 2002, em Jaboticabal- SP, nasceu o primeiro clone a partir de célula



diferenciada adulta, a Penta. E em Dezembro de 2003, nasceu a Bela da USP, uma bezerra Nelore oriunda de célula diferenciada adulta, apresentando desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais (MELLO et al., 2003).

2. CONTEÚDO

2.1 APICAÇÃO DA TÉCNICA DE CLONAGEM

Atualmente a clonagem é utilizada principalmente por dois fatores, em rebanhos de elite para produzir cópias genômicas de alto valor genético, e como fonte terapêutica que refere-se ao uso de transferência nuclear para produzir células ou tecidos para auxílio no tratamento de doenças degenerativas, traumáticas ou de origem genética (TRECENZI & ZAPPA, 2013).

2.2 TÉCNICAS DA TECNOLOGIA DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

A produção de animais pela técnica de transferência nuclear envolve múltiplas etapas cada uma podendo influenciar diretamente no resultado final (PEREIRA & FREITAS, 2009). Existem procedimentos necessários para realização do processo de clonagem: (1) maturação dos oócitos receptores; (2) Enucleação ou remoção da cromatina dos oócitos receptores; (3) preparação e transferência das células doadoras de núcleo e fusão destas com os oócitos receptores; (4) ativação dos oócitos receptores; (5) cultivo e transferência dos embriões reconstituídos para fêmeas receptoras (GONÇALVES, et. al., 2008).

2.2.1 Preparação dos oócitos receptores

A fonte e a qualidade do citoplasma receptor (citoplasto) representam fatores importantes para o sucesso da técnica de transferência nuclear. Neste sentido, vários estudos já foram desenvolvidos buscando avaliar o estágio nuclear adequado



deste citoplasto receptor em programas de transferência nuclear. Contudo, diferentes estudos têm demonstrado que oócitos em metáfase II (MII) são mais adequados para suportar a reprogramação nuclear quando comparados aos demais estádios de desenvolvimentos já empregados (ZOU et al., 2001; LEE et al., 2007).

Estes representam um dos principais componentes na produção de embriões por transferência nuclear, pois contem os fatores responsáveis pela reprogramação nuclear. Portanto tal reprogramação dos núcleos transferidos é para suportar o período inicial do desenvolvimento embrionário. Além disso, o estágio do ciclo celular no momento da enucleação e da transferência nuclear é decisivo para garantir uma boa interação entre o citoplasma do oócito receptor e o núcleo transferido. As três principais etapas da transferência nuclear relacionada aos oócitos receptores são: maturação, enucleação e ativação (GONÇALVES, et. al., 2008).

2.2.2 Maturação

A maturação dos oócitos refere-se a uma fase meiótica que consiste em conduzir os oócitos até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica ou metáfase II. Esta maturação até a metáfase II pode ser feita *in vivo* ou *in vitro*, sendo que na primeira os oócitos são normalmente recuperados no oviduto após a ovulação, ou diretamente dos folículos próximo ao momento da ovulação (GONÇALVES, et. al., 2008). Em caso de bovinos, o uso de oócitos maturados *in vitro* apresenta uma série de vantagens quando comparados àqueles maturados *in vivo*. Tem sido demonstrada uma variedade de fatores que interferem negativamente sobre a qualidade de oócitos maturados *in vivo*, dentre os quais podem ser citados a idade da doadora e o protocolo de superestimulação ovariana (CAMPBELL et al., 2007).

2.2.3 Enucleação



O procedimento mais comum ainda utilizado de enucleação é através da microaspiração de uma porção do citoplasma com auxílio de uma micropipeta. A preparação dos oócitos para a enucleação consiste na retirada das células do *cumulus*, seguida por uma criteriosa seleção dos oócitos, incluindo os aspectos do citoplasma e a presença de um corpúsculo polar, e finalmente a exposição dos oócitos às substâncias desestabilizadoras do citoesqueleto (GONÇALVES, et. al., 2008).

Gonçalves, et. al. (2008), citou que mais recentemente que pesquisadores adaptaram um protocolo que permite a enucleação dos oócitos e a transferência nuclear sem uso de micromanipuladores. Esse método foi então conhecido como “método de clonagem manual”. Em seguida um outro pesquisador, ainda criou um método mais alternativo, que foi posteriormente adaptado e conhecido como zone-free. Porém a maioria das etapas utilizadas neste protocolo é idêntica às descritas anteriormente no método de clonagem manual, sendo que as principais diferenças referem-se ao processo de enucleação. Além disso este método não requer segundo processo de fusão para recomposição do citoplasma.

2.2.4 Reconstrução e ativação

Para a reconstrução do embrião após a transferência nuclear, o núcleo de célula doadora (carioplasto) é transferido para o interior de um citoplasma receptor (citoplasto). Cada célula doadora isolada individualmente com base no cultivo prévio é inserida no espaço perivitelino de um oócito enucleado para posterior estimulação com um pulso elétrico, o qual promove a fusão das membranas adjacentes. O pulso elétrico não somente induz a fusão da célula somática com o oócito enucleado para formar um novo complexo, mas também promove uma importante liberação de cálcio intracelular que inicia o processo de ativação (HEYMAN, 2005).

O processo de ativação refere-se à indução da degradação de complexos enzimáticos responsáveis por manter os oócitos no estágio de metáfase II. Ela permite a finalização do processo meiótico, conduzindo os oócitos ao início do



desenvolvimento embrionário. Os oócitos então permanecem bloqueados em metáfase II pela ação de um complexo de proteínas, denominado fator intracelular promotor da fase M (MPF) (GONÇALVES, et. al., 2008).

Fisiologicamente, no caso da fecundação, o espermatozoide ao penetrar no óvulo, induz a degradação do MPF (Fator promotor de maturação) desencadeando assim o fim da meiose e início do desenvolvimento embrionário. No entanto artificialmente a ativação dos oócitos se baseia na indução de oscilações de cálcio (SWAN & OZIL, 1994; TRECENTI & ZAPPA, 2013).

A ativação consiste na etapa chave do processo de transferência nuclear e pode ser obtida física e/ou quimicamente, por métodos que podem ou não estar diretamente ligados aos níveis de cálcio intracelular. Quanto aos meios físicos, pode ser citada a injeção de cálcio diretamente no citoplasma, promovendo em seguida estímulos elétricos que promoverão a liberação de concentrações intracelulares de cálcio (TRECENTI & ZAPPA, 2013).. Os oócitos também podem ser ativados quimicamente por meio da utilização de cálcio ionóforo, A23187 (CIBELLI et al., 1998), ionomicina (HILL et al., 2001), ciclohexamida (KEEFER et al., 2002) entre outros.

2.2.5 Cultivo e transferência de embriões reconstituídos para fêmeas receptoras

Após a fusão e a ativação, os embriões reconstruídos são cultivados *in vitro* com uma suplementação de componentes os quais podem auxiliar no desenvolvimento, mas que, por um período longo de exposição, podem alterar negativamente a qualidade do embrião (PEREIRA & FREITAS, 2009), até o estágio de blastocisto, utilizando uma variedade de sistemas de cultivo rotineiramente usados na produção *in vitro* (PIV) de embriões, dentre os quais podem ser citados sistemas de co-cultivo utilizando células primárias do oviduto ou linhagens celulares estabelecidas (THOMPSON, 2000, TRECENTI & ZAPPA, 2013).



Em ruminantes, os procedimentos de transferência de embriões podem ser cirúrgicos, semicirúrgicos ou não cirúrgicos. Em bovinos, consiste em inserir, por via transcervical, embriões no corno uterino ipsilateral ao ovário, apresentando pelo menos um corpo lúteo (CIBELLI et al., 1998; CHAVATTE-PALMER et al., 2002; PEREIRA & FREITAS, 2009).

Em um estudo citado por Pereira & Freitas (2009), com relação à origem do embrião transferido demonstrou que embriões produzidos *in vitro* obteve maior porcentagem de partos ao fim da gestação, ao comparar com os oriundos de células embrionárias, células somáticas fetais, ou células somáticas adultas, respectivamente.

2.3 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À TÉCNICA

Além da influência que variações da técnica de reconstituição oocitária para a produção de embriões reconstituídos possam exercer sobre o potencial de desenvolvimento dos mesmos (técnica de reconstituição empregada para enucleação e introdução do núcleo doador, sincronização do ciclo celular do núcleo doador com o citoplasto, método de ativação oocitária e condições de cultivo *in vitro*), variações com o uso de diferentes tipos celulares em diferentes estádios de diferenciação, número de passagens do cultivo celular das células doadoras de núcleo e uso de citoplastos contendo mtDNA (DNA mitocondrial) diferente do animal doador, podem ter reflexos na eficiência final do processo de clonagem (CAMPBELL et al., 2005).

Em bovinos, perdas peri-implantacionais são importantes e a proporção de perdas de prenhez neste período pode ser estimada em 50% (CIBELLI et al., 1998). Essas perdas precoces são frequentemente associadas com deficiências funcionais que ocorrem no início da placentação, caracterizada por vascularização anormal de tecidos embrionários e redução no número de placentomas (HEYMAN, 2005).



2.4 PROBLEMAS NA SAÚDE DO NEONATAL

O aumento de peso ao nascer é uma característica bastante comum em ruminantes oriundos da clonagem, tanto que o fenômeno tem sido referido como síndrome do bezerro grande LCS (do inglês Large calf syndrome). Não se sabe ainda se o LCS é um problema com origem na clonagem , pois ele também ocorre em animais oriundos de fecundação *in vitro*, o que sugere que seja devido ao sistema de cultivo oocitário ou embrionário (WILSON et al., 1995; TRECENTI & ZAPPA, 2013).

Problemas respiratórios tem sido relatados com muita frequência em bezerros e infecções constantes e de diversas ordens sugerem que animais possuem deficiência imunológica (hemácias e leucócitos reduzidos). Constatou-se ainda que bezerros advindos de células fetais apresentam em maior ocorrência as seguintes anomalias: anomalia umbilical com infecção de uracu persistente, pouca tolerância ao estresse e anestesia, broncopneumonia e em casos de mortes após o nascimento, sintomas de edema generalizado e ascite (TRECENTI & ZAPPA, 2013).

2.5 DESENVOLVIMENTO PÓS PARTO

De maneira geral, a ocorrência da mortalidade pós-natal é observada da 1ª semana ao 4º mês de vida do animal. Nesse período uma grande variedade de problemas tem sido relatada em clones, incluindo infecções, tais como inflamações do rúmen e abomaso, coccidiose e infecções após traumas. A proporção de bezerros clones nascidos que são viáveis ao desenvolvimento normal até a fase adulta é limitada aos 50-70%, de acordo com vários grupos de pesquisas (PEREIRA & FREITAS, 2013).

Com relação às características reprodutivas Trecenti & Zappa (2013), cita que com relação à puberdade, dominância folicular, e perfil hormonal as novilhas clonadas não sofrem alteração em comparação as não clonadas.



3. CONCLUSÃO

Conclui-se que a clonagem é a produção de um indivíduo geneticamente idêntico ao outro por meios artificiais, sendo esta técnica de extremo interesse econômico, pois pode multiplicar um animal que detém uma característica geneticamente valorizada. A técnica de clonagem animal ainda é um processo recente e está sendo aprimorado, no início o índice de mortalidade era grande, porém nos dias de hoje com o aprimoramento das técnicas este tem diminuído.

Por fim, no Brasil, a clonagem de bovinos já é uma realidade para produzir animais elite a serem empregados no melhoramento de vários rebanhos. No entanto, atualmente a demanda de clonagem para animais de corte e principalmente leite, vem aumentando o que gera grandes perspectivas para esta biotécnica da reprodução.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPBELL KHS, ALBERIO R, CHOI I, FISHER P, KELLY RDW, LEE JH, MAALOUF W. **Cloning: eight years after Dolly**. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.256-268, 2005.

CAMPBELL KHS, FISHER P, CHEN WC, CHOI I, KELLY RDW, LEE JH, XHU J. **Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives**. *Theriogenology*, v.68, p.214-231, 2007.

CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RICHARD C, MONGET P, LEBOURHIS D, KANN G, CHILLIARD Y, VIGNON X, RENARD JP. **Clinical, hormonal and hematological characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells**. *Biol Reprod*, v.66, p.1596-1603, 2002.

CIBELLI JB, STICE SL, GOLUEKE PJ, KANE JJ, JERRY J, Blackwell C, PONDE de Leon A, ROBL J. **Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast**. *Science*, v.280, p.1256-1258, 1998.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. Ed. ROCA. São Paulo, 2008.



HEYMAN Y. **Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle.** *Reprod Nutr Dev*, v.45, p.353-361, 2005.

HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. **Cloning of domestic species.** *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.42, p.427-436, 1996.

HILL JR, WINGER QA, BURGHARDT RC, WESTUSIN ME. **Bovine nuclear transfer embryo using cells derived from a cloned fetus.** *Anim Reprod Sci*, v.68, p.17-26, 2001.

KEEFER CL, KEYSTON R, LAZARIS A, BHATIA B, BEGIN I, BILODEAU AS, ZHOU FJ, KAFIDI N, WANG B, BALDASSARRE H, KARATZAS CN. **Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells.** *Biol Reprod*, v.66, p.199-203, 2002.

LEE SH., KUMAR BM, KIM JG, OCK SA, JEON BG, BALASUBRAMANIAN S, CHOE SY, RHO GH. **Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells.** *Reprod Domest Anim*, v.42, p.44-52, 2007.

MELLO, M. R. B.; CAETANO, H. V. A.; MARQUES, M. G. et al. **Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, n. 11, p. 1485- 1489, 2003.

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. **Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.118-128, jul./set. 2009.

SWANN, K., OZIL,J-P.Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.*, v.152, p.183-222, 1994.

THOMPSON JG. **In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos- a decade of achievement.** *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.263-275, 2000.

TRECENTI, A, S., ZAPPA, V. Clonagem animal: Revisão de literatura. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA** Ano XI – Número 20 – Janeiro de 2013 – Periódicos Semestral.

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; McCALLA, D. F. **Comparison of birthweight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating.** *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.38, p.73-83, 1995.

ZOU X, CHEN Y, WANG Y, LUO J, ZHAN Q, ZHANG X, YANG Y, JU H, SHEN Y, LAO W, XU S, DU M. **Production of cloned goats from enucleated oocytes**



injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning*, v.3, p.31-37, 2001.

