

# BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL

## Clonagem e transgenia animal

José Antonio VISINTIN<sup>1</sup>, Marco Roberto Bourg MELLO, Marcella Pecora MILAZZOTTO, Mayra Elena Ortiz D'Ávila ASSUMPÇÃO

O desenvolvimento, aprimoramento e uso de biotécnicas aplicadas à reprodução animal são, atualmente, indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. Enquanto algumas já apresentam grande apelo comercial e importância econômica como a inseminação artificial, a transferência e criopreservação de embriões e a produção de embriões por fecundação *in vitro*, outras ainda iniciam sua inserção no mercado como a clonagem ou permanecem mais restritas a centros de pesquisa, como a transgenia.

A clonagem, originalmente, desenvolveu-se como método para estudar os mecanismos envolvidos na diferenciação celular (ROBL et al, 1987). Hans Spemann, um dos grandes biólogos experimentais do século XX, foi o pioneiro nos estudos sobre totipotência de células embrionárias. Em experimentos realizados em 1902, Spemann separou os blastômeros de embriões de 2 células de salamandra, dando origem a indivíduos adultos, evidenciando sua totipotência. No entanto, apenas em 1951 foi realizado com sucesso o primeiro experimento com transferência nuclear (TN) (BRIGGS e KING, 1952). Pesquisadores da Filadélfia enuclearam oócitos de rã e os fundiram com células de embrião no estágio de blástula, que se desenvolveram até o estágio de girino (WILMUT; CAMPBELL; TUDGE, 2000).

Desde o clássico trabalho de Briggs e King em anfíbios, o método da transferência nuclear tem sido empregado na produção de indivíduos geneticamente idênticos (FULKA et al., 1998). Em mamíferos, o primeiro sucesso foi obtido em camundongos por Illmensee e Hoppe (1981), utilizando células de embriões como núcleos doadores. A clonagem empregando células diferenciadas adultas foi realizada com sucesso, pela primeira vez, em ovinos (WILMUT et al., 1997). Neste experimento, após a reconstrução de 277 embriões com células da glândula mamária, obteve-se o nascimento da ovelha Dolly. A grande repercussão gerada por este acontecimento foi decorrente da demonstração, pela primeira vez, de que era possível clonar um mamífero a partir de uma célula somática diferenciada. Após publicação de Wilmut et al. (1997), o sucesso da clonagem com células diferenciadas foi também alcançado em bovinos, murinos, caprinos, suínos, felinos e equídeos (BAGUISI et al., 1999; KATO et al., 1998; ONISHI et al., 2000; SHIN et al., 2002; WAKAYAMA et al., 1998; WOODS et al., 2003).

---

<sup>1</sup> Médico veterinário, Professor Titular, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP, São Paulo, SP.

No Brasil, foram conseguidos clones bovinos a partir de células embrionárias, fetais e adultas. No dia 17 de 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 (MELLO et al., 2003), 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. Em 15 de Dezembro de 2003 nasceu a Bela da USP, uma bezerra Nelore oriunda de célula diferenciada adulta, apresentando desenvolvimento corporal, comportamental e sexual normais.

Ao contrário do que muitos imaginam, a idéia inicial da clonagem não foi a produção de animais geneticamente idênticos com apelo comercial. O nascimento da ovelha Dolly foi, na verdade, o desenvolvimento da metodologia necessária para a criação de animais como a ovelha Polly. A ovelha Polly foi produzida seguindo o processo que gerou a Dolly, com a diferença de que foi introduzido na célula doadora de núcleo um gene humano. Assim, a ovelha resultante foi capaz de produzir leite com proteína humana, de valor terapêutico.

A possibilidade de introdução de genes exógenos no genoma de células estabelecidas *in vitro* e a utilização destas como núcleos doadores na reconstrução embrionária pela Transferência Nuclear abrem nova perspectiva para produção de animais transgênicos. Diferentes linhagens de células bovinas são isoladas e cultivadas,

podendo um gene de interesse ser inserido nestas células juntamente com um gene de seleção (resistência a antibióticos). As células que expressam a construção gênica são selecionadas, cultivadas *in vitro* e utilizadas como fonte doadora de núcleos. As células transgênicas em cultivo podem ainda ser facilmente criopreservadas, assegurando a conservação de material genético para reconstrução de embriões. A maior vantagem da técnica de Transferência Nuclear para produção de animais transgênicos, quando comparada à microinjeção de DNA em pró-núcleos de zigotos é a economia de tempo e custos. A produção de animais transgênicos por transferência nuclear de células somáticas modificadas *in vitro* já foi relatada em diversas espécies (SCHNIEKE et al., 1997, PARK et al., 2001, BROPHY et al., 2003). O maior pré requisito para o sucesso da técnica, no entanto é a disponibilidade de células primárias ou linhagens celulares compatíveis com as modificações genéticas necessárias para o ganho ou perda de função. Diversos casos já foram descritos visando ganho de função como ovinos produzindo o fator IX de coagulação no leite, caprinos produzindo antitrombina III e suínos expressando GFP (SCHNIEKE et al., 1997; BAGUISI et al., 1999; PARK et al., 2001).

Apesar dos primeiros experimentos para a obtenção de animais transgênicos terem sido conduzidos em ratos, durante os últimos 15 anos estudos têm sido voltados para animais de interesse zootécnico, com o intuito de aumentar a produção animal (PINKERT e MURRAY, 1999). Devido à indisponibilidade de linhagens estabelecidas de células tronco embrio-

nárias para a produção de quimeras e à dificuldade na injeção de DNA exógeno em pronúcleos de zigotos devido a coloração escura do citoplasma, até pouco tempo a técnica de TN era a opção mais promissora na geração de animais de produção transgênicos. No entanto, a eficiência na geração de progênie transgênica ainda permanecia baixa e inconstante. Assim, metodologias alternativas foram sendo desenvolvidas.

Recentemente, a combinação de vetores virais para a introdução do transgene tem tornado o processo mais eficiente (GOJO et al., 2002). A possibilidade de sua utilização diretamente em células germinativas e/ou embrionárias com excelentes resultados fazem dos vetores virais alvos de diversos estudos (JAENISCH, 1976; TISCORNIA et al, 2003; HOFMANN et al, 2004). Hofmann et al. (2004) relataram a transdução efetiva de vetores lentivirais para expressão estável da GFP em oócitos bovinos que foram posteriormente utilizados para fecundação *in vitro* (FIV), gerando 83% de embriões fluorescentes. Outra vantagem é a possibilidade de se transduzir com eficiência vetores para modulação gênica, promovido pelos RNAs de interferência (TISCORNIA et al, 2003). Assim, fenótipos desejáveis, como no caso do bloqueio total da miostatina resultando no fenótipo de musculatura dupla em bovinos (MCPHERRON et al., 1997), que pudessem vir acompanhados de características não desejáveis (POTTS et al, 2003), poderiam ser atenuados pelo bloqueio apenas parcial da miostatina (MILAZZOTTO et al, 2007).

Outra abordagem é o uso de espermatozoides como vetores de DNA exógeno. Sabe-se que as

células espermáticas têm a capacidade de se ligar a proteínas e DNA em quase todas as espécies (LAVITRANO, et al., 1989). Desta forma, elas podem ser usadas como vetores naturais para introduzir moléculas de DNA exógeno no oócito durante o processo de fecundação. Simões et al (2007) ao submeterem células espermáticas bovinas a diversos tratamentos para inserção do DNA exógeno obtiveram embriões positivos para a presença do transgene em todos os grupos estudados.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de bovinos a partir da técnica de Transferência Nuclear utilizando células somáticas diferenciadas possibilita a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos em larga escala e também bovinos transgênicos (geneticamente modificados). No entanto, as taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões clonados a partir de células diferenciadas permanecem baixas (BORDIGNON, 2003). Este insucesso deve-se, principalmente, a baixa taxa de implantação, pelos freqüentes problemas placentários e pela alta mortalidade embrionária, fetal e perinatal. Esses problemas, segundo Bordignon (2003), ocorrem porque núcleos de células diferenciadas não são corretamente reconduzidos ao estágio embrionário nos embriões clonados (reprogramação nuclear), o que provocaria a expressão errônea de genes que são necessários para sustentar o desenvolvimento normal. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reprogramação nuclear representa um dos principais desafios para aumentar a eficiência da clonagem, visto que hoje a técnica vem sendo aplicada inclusive comercialmente.

A melhora na eficiência da técnica de TN também será refletida no campo da transgenia animal. Atualmente, com a identificação cada vez maior de genes de interesse zootécnico e terapêutico, tem havido um maior interesse na geração de animais de produção transgênicos. Assim, a otimização das tecnologias de produção desses animais e inserção do transgene na linhagem germinativa tornam-se cada vez mais essenciais para o crescimento econômico.

Embora haja grande interesse na utilização da Transferência Nuclear e da transgenia nas áreas da produção animal, biomedicina, biotecnologia e na pesquisa básica, a expansão e difusão desta tecnologia estão limitadas pela baixa eficiência de todo o processo de clonagem. O melhor entendimento dos eventos envolvidos na reprogramação nuclear poderá trazer resultados mais previsíveis e com maior reprodutibilidade, tornando a técnica mais segura, tanto para pesquisa quanto para a produção animal.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D.T. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.
- BORDIGNON, V. Animal Cloning by Nuclear Transplantation: progress and future challenges. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 74-89, 2003. Suplemento.
- BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proceedings of the National Academic Society**, v. 38, n. 4, p. 455-463, 1952.
- BROPHY, B., SMOLENSKI, G., WHEELER, T. et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 157-162, 2003
- FULKA, J.; FIRST, N. L.; LOI, P.; MOOR, R. M. Cloning by somatic cell nuclear transfer. **BioEssays**, v. 20, n. 10, p. 847-851, 1998.
- GOJO, S.; YAMAMOTO, S.; PATIENCE, C.; et al. Gene therapy – its potential in surgery. **Annals of the Royal College of Surgeons England**, v. 84, p. 297-301, 2002.
- HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; et al. Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 405-09, 2004.
- ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in mus musculus: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v. 23, n. 1, p. 9-18, 1981.
- JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian Transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 73, p. 1296-1264, 1976.
- KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2095-2098, 1998.
- LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M. et al. Sperm cell as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation in mice. **Cell**, v. 57, n. 5, p. 717-723, 1989.
- MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to

- mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the national Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 12457 – 61, 1997.
- 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.
- MILAZZOTTO, M. P., FEITOSA, W. B., STRAUSS, B. E. et al. Myostatin gene knockdown through lentiviral vector-mediated delivery of shRNA for in vitro production of transgenic bovine embryos In: International Embryo Transfer Society, 2007, Kyoto. **Reproduction, Fertility and Development.**, v.19. p.120 – 120, 2007.
- ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T. et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, v. 289, n. 5482, p. 1188-1190, 2000.
- PARK, K. W., CHEONG, H.T., LAI, L. et al. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. **Animal Biotechnology**. v. 12, p. 173-181, 2001
- PINKERT, C.A.; MURRAY J.D. **Transgenic Farm Animals em Transgenic Animals in Agriculture** ed. CAB International, NY. 1999.
- POTTS, J. K.; ECHTERNKAMP, S.E.; SMITH, T.P.L.; REECY, J.M. Characterization of gene expression in double-musled and normal-musled bovine embryos. **Animal Genetics**, v. 34, p. 438–444, 2003.
- ROBL, J. M.; PRATHER, R.; BARNES, F. et al. Nuclear transplantation in bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 2, p. 642-647, 1987.
- SCHNIEKE, A.E., KIND, A.J., RITCHIE, W.A. et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**. v. 278, p. 2130-2133, 1997
- SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J. et al. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 859, 2002.
- SIMÕES, R., BINELLI, M., NICACIO, A. C. et al. Use of spermatozoa as vectors of exogenous DNA for in vitro production of bovine transgenic embryos In: International Embryo Transfer Society, 2007, Kyoto. **Reproduction, Fertility and Development.**, v.19. p.320 – 320, 2007.
- TISCORNIA, G.; SINGER, O.; IKAWA, M.; VERMA, I.M. A general method for gene *knockdown* in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 100, p.1844–1848, 2003.
- WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Letters to Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369-374, 1998.
- WILMUT, I.; CAMPBELL, K.; TUDGE, C. **Dolly: a segunda criação**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2000. 394 p.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Letters to Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.
- WOODS, G. L.; WHITE, K. L.; VANDERWALL, D. K. et al. A mule

cloned from fetal cells by nuclear transfer. Scienceexpress. Disponível em: ([www.scienceexpress.org](http://www.scienceexpress.org)). Acesso em: 29 maio 2003.