

## TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL GENÉTICO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICO: METODOLOGIAS PARA ACELERAR O GANHO GENÉTICO?

FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Avenida Duque de Caxias Norte 225 Pirassununga São Paulo. CEP 13610-630 endereço eletrônico: meirellf@usp.br

**RESUMO** - A habilidade do oócito em receber um núcleo haplóide, modifica-lo e utiliza-lo para recompor um novo ser embora não compreendida por completo já é há muito conhecida. Gradativamente, vem sendo desvendada a capacidade do citoplasma do oócito em realizar diversas outras modificações, como em núcleos embrionários ou somáticos. Estas modificações denominadas hoje de reprogramação podem em um período muito curto depois da reconstrução de um embrião por transferência de núcleo reverter a condição diferenciada de uma célula somática para a *totipotente* de um embrião. Nesta revisão estaremos discutindo a possibilidade da aplicação deste conhecimento na área do melhoramento genético animal e suas possíveis repercussões nos indivíduos produzidos pela técnica de transferência de núcleo e na pecuária bovina do futuro.

### INTRODUÇÃO

A micromanipulação de embriões é uma metodologia que permite o estudo da interação núcleo citoplasmática e vem sendo aplicada há algumas décadas (Brigs and King., 1953). Desde então estudos envolvendo estas metodologias vem servindo a ciência em diversas maneiras como por exemplo no auxílio na compreensão dos mecanismos de controle citoplasmático do ciclo celular, que levaram ao conhecimento do fator promotor de meiose (MPF), parte do complexo ciclina e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que permitiu os avanços da ciência na compreensão de doenças como o câncer.

Atualmente, a clonagem em mamíferos ou transferência de núcleos é a grande responsável pelo conhecimento da técnica de micromanipulação de embriões por toda a sociedade. Desde o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997), foi aberto uma grande perspectiva para a produção pecuária. Diversos grupos têm tido sucesso na produção de indivíduos por transferência de núcleo de células somáticas e muito tem sido questionado quanto a aplicabilidade desta técnica na pecuária e seus riscos para a sociedade. Nesta revisão pretende-se colocar alguns pontos para dar mais subsídios para esta discussão.

### TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEOS

A técnica de transferência de núcleo é um processo de múltiplas etapas que visam gerar um organismo inteiro a partir do DNA nuclear de uma só célula (Wells, 2003). A metodologia similar ao descrito com os anfíbios foi usada com sucesso em animais de produção durante a década de 80 (Willadsen, 1986; Prather et al., 1987; Prather et al., 1989; Smith et al., 1989) a partir de células embrionárias indiferenciadas. Até então aparentemente somente células *totipotentes* serviriam como doadoras de núcleos e sendo assim um processo de reclonagem poderia com uma certa dificuldade gerar um número ilimitado de indivíduos idênticos.

Em meados da década de 90, células somáticas mantidas em cultivo foram reprogramadas para o desenvolvimento de um ser completo (Campbell et al., 1996; Wilmut et al., 1997). E desde então muitos grupos vem desenvolvendo esta metodologia ou adaptações em diversos laboratórios alocados em todos os continentes (Wells, 1997).

Como já foi exaustivamente descrito na mídia, a clonagem é a fusão de uma célula somática ou não com um oócito enucleado (Figura 1). O ovócito é a célula que tem grande função nesta técnica. De maneira ainda pouco conhecida, o citoplasma do ovócito é capaz de reprogramar um núcleo e reverte-lo ao estágio de zigoto (zigoto reconstituído). Levando-se em consideração que um grande número de ovócitos podem ser obtidos por punção de ovários colhidos em abatedouros e que as células somáticas podem ser facilmente multiplicadas em cultivo, é quase ilimitado o número de embriões geneticamente idênticos que podem ser produzidos.

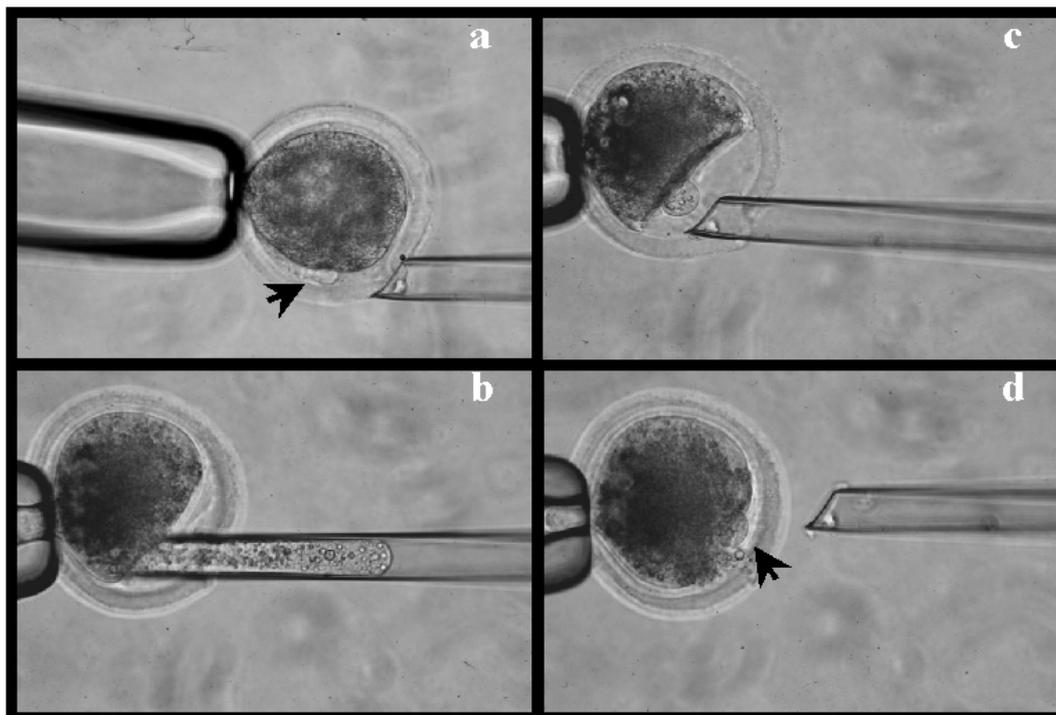


FIGURA 1. Fotomicrografias da técnica de transferência de núcleo mediante enucleação em telófase II. a) localização do segundo corpúsculo polar seta. b) Aspiração do corpúsculo polar e do conteúdo citoplasmático adjacente. c) Introdução da célula de doadora de núcleo na região peri-vitelínea. d) conjunto pronto para eletrofusão com seta indicando a localização da célula contendo o núcleo. (adaptado de Meirelles, 2004)

Além do número ilimitado de cópias idênticas de um indivíduo de características fenotípicas conhecidas, a transferência de núcleos abre uma perspectiva muito maior para a produção de animais geneticamente modificados. Durante um cultivo de células, é possível introduzir fragmentos de DNA e selecionar as células que receberam o inserto. Mais importante favorece a introdução de inserto de DNA em uma posição desejada (recombinação homóloga).

Estas duas biotecnias (clonagem e transgenia), juntas são muito poderosas e podem, especialmente na bovinocultura, revolucionar a pecuária.

#### **EFICIÊNCIA DA CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEOS SOMÁTICOS**

Pode-se dizer que a eficiência da técnica é baixa, e que deve melhorar significativamente até que possa ser aplicada em larga escala.

Em termos gerais, de cem oócitos manipulados em um dia por um técnico bem treinado, pode-se produzir cinquenta zigotos reconstituídos que terão uma taxa de desenvolvimento à Blastocisto similar aos processo de Fertilização *in vitro* (35 à 40%). A taxa de gestação também se aproxima muito dos embriões produzidos *in vitro*, todavia somente 15% dos embriões transferidos nascem em boas condições.

Estes dados mostram que a técnica teve uma evolução incrível nos últimos anos. Um grande número de laboratórios trabalhando no aprimoramento da técnica e o conhecimento básico dos fenômenos epigenéticos e de reprogramação nuclear juntos deverão em um futuro próximo gerar os índices desejáveis de nascimento. O desenvolvimento na técnica obtido até o momento tira os argumentos de ineficiência utilizados até então (Smith et al., 2000).

Outro ponto, porém que distancia a aplicação em larga escala da técnica de transferência de núcleos é que ela é muito dependente de uma mão de obra artesanal e muito qualificada e deve passar a ser altamente efetiva quando for automatizada. Uma vez atingido o potencial, a técnica deve ganhar o campo (Meirelles, 2004).

### ANOMALIAS EPIGENÉTICAS

Para que uma embriogênese normal ocorra à partir de um embrião reconstruído, é necessário que o núcleo somático seja completamente reprogramado, de maneira que siga os padrões embrionários de expressão gênica. Esta reprogramação precisa ocorrer em um período muito curto e portanto passa a ser sujeita a erros (Wells., 2003). Um número grande de trabalhos vem demonstrando desvios na reprogramação epigenética, e as perdas embrionárias e a mortalidade nos clones possivelmente refletem uma expressão inapropriada de vários genes. As aberrações ocorrem normalmente durante o início do desenvolvimento embrionário e fetal (especialmente na placenta; Inoue et al., 2002), porém raramente podem apresentar-se persistente até a idade adulta.

Via de regra as alterações conhecidas nos indivíduos que chegam a termo são: i) problemas de sinalização de parto que levam a indivíduos com peso excessivo ou imaturidade do tecido pulmonar – problema relativamente bem contornado por programas de indução de partos. ii) Comprometimento no sistema imune, como aplasia do timo (Renard et al., 1999; Yamazaki et al., 2004). iii) Problema renal como hidronéfrons ou outras patologias menores (Wells, 2003).

Obviamente é importante monitorar não somente a saúde dos clones, mas também o da progênie subsequente produzida por processos de reprodução sexual. Uma série de trabalhos visando este aspecto da herança epigenética foram realizados e sugerem fortemente que os processos de produção dos gametas e a embriogênese normal podem apagar possíveis erros epigenéticos dos descendentes dos animais clonados (Wakayama et al., 1998; Wells et al., 1998; Lanza et al., 2001). Estes últimos achados levaram a sociedade internacional de transferência de embriões em janeiro de 2004 considerar que os descendentes dos clones são tão normais como qualquer outro animal.

### CITOPLASTOS

Muito se fala sobre a transferência de núcleo e pouca importância vem sendo dada ao citoplasto, apesar de claramente ser o citoplasma do oócito o responsável por todo o processo de reprogramação nuclear que envolve a clonagem. Conforme exemplificado na figura 1, a técnica de transferência de núcleos depende da disposição de citoplasma de oócitos enucleados via de regra obtidos a partir ovários colhidos de animais em abatedouros.

É natural que gametas obtidos de animais abatidos não sejam na sua totalidade competentes para o desenvolvimento tendo em vista que parte dos folículos recuperados podem por exemplo estar em processo de atresia desencadeado por um folículo dominante ou por um aumento da secreção do hormônio luteinizante (Sirard, 2004).

Quando uma célula é fundida com um citoplasto, pode-se a grosso modo pensar em uma mudança de ambiente e obviamente espera-se que o ambiente citoplasmático tenha potencial de alterar o fenótipo de um indivíduo.

Dois vias possibilitam a mudança no fenótipo do conceito: i) Uma ação das mensagens e proteínas estocadas no citoplasma sobre as primeiras divisões celulares embrionárias (herança citoplasmática) ii) Uma ação das mensagens e proteínas presentes no citoplasto sobre a cromatina e o DNA do núcleo introduzido via alteração do padrão de metilação e acetilação no DNA ou em histonas (efeito epigenético).

Outra variação introduzida pelo citoplasto é devida a organela citoplasmática denominada mitocôndria. A mitocôndria é bastante conhecida por seu papel na síntese bioenergética celular mediante o metabolismo oxidativo. Apesar da organela abrigar as reações da OXPHOS, o seu genoma (mtDNA) codifica somente parte das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa (13 das aproximadamente 70), as demais são transcritas no núcleo, traduzidas e exportadas para a organela (Clayton., 2000). O mtDNA tem um padrão de herança tipicamente citoplasmático, e foi durante muito tempo reconhecido como uma herança materna restrita.

Estudos de polimorfismos em genes visando estudos filogenéticos e genealógicos aplicam freqüentemente o DNA mitocondrial (mtDNA). O genoma da mitocôndria é bastante interessante. Principalmente para estudos de linhagens maternas, já que este genoma tem uma alta taxa de mutação (10 vezes maior que a dos genes nucleares).

Aplicando a tecnologia de marcadores moleculares mitocondriais foi possível estudar a formação dos rebanhos zebuínos na Ásia, África (Loftus et al., 1994) e Américas (Meirelles et al., 1999). Como demonstra a figura 2, os rebanhos africanos e americanos tiveram uma origem semelhante, partindo de fêmeas ancestrais de origem européia. Todavia, estes eventos ocorreram isoladamente, e no caso do rebanho africano sem a interferência do homem.

No zebu americano, a grande maioria dos animais foi criada por cruzamento absorvente, restando, no entanto alguns portadores do mtDNA asiático representados principalmente pelos animais POI.

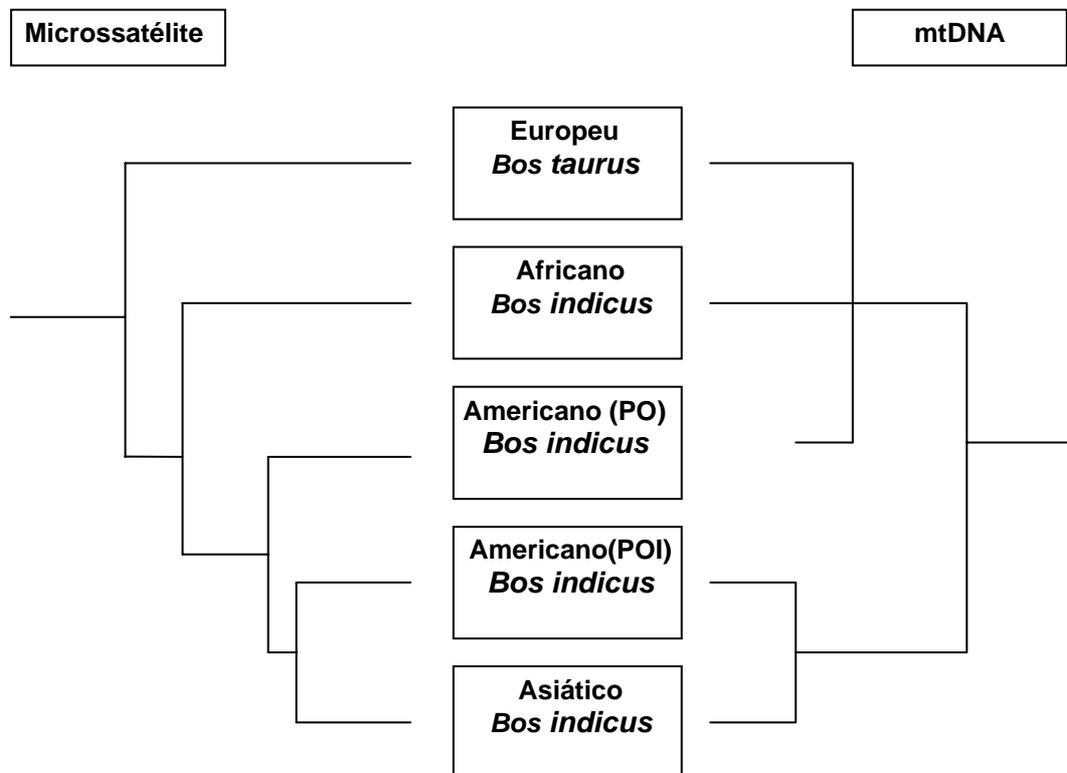


FIGURA 2. Dendrograma produzido a partir dos dados de polimorfismos do DNA mitocondrial e comparação das freqüências de alelos microssatélites em animais *Bos indicus* oriundos dos diferentes continentes. Animais Europeus foram incluídos para comparação. (adaptado de Bradley et al., 1996)

Um efeito de linhagens maternas sobre a produção animal foi demonstrado no passado por uma equipe trabalhando com gado holandês, todavia estes dados são ainda bastante controversos e não é conhecido o efeito do mtDNA sobre a produção animal. Em humanos uma série de doenças ligadas ao mtDNA são conhecidas e levam normalmente a problemas neuro ou miodegenerativos. A técnica de transferência de núcleo é uma ferramenta que permite mudar o genoma mitocôndrial de um animal, como foi o caso da ovelha Doly, mas também com animais portadores de mtDNA indiano quando transferidos para citoplasmas portadores de mtDNA europeu (Meirelles et al., 2001; Ramires et al., Dados não publicados).

### CLONAGEM NOS BOVINOS

A clonagem terá na medida que for possível sua aplicação comercial em larga escala um grande impacto sobre a bovinocultura. Esta afirmação é feita baseada em comparações com outras espécies. Por exemplo, aves e suínos têm um intervalo entre gerações muito mais curto e um número de descendentes por fêmea muito maior. Estas duas características permitem a criação de linhagens, mediante seleção maciça de raças puras e formação de indivíduos "híbridos", para atender o mercado de carne ou ovos. Nestas espécies, é muito limitado o número de granjas de seleção, e a maioria delas está sediada em países com tradição em pesquisa.

Com o advento da TN, a espécie bovina passa a ter uma condição muito similar as espécies suína e aves, com possibilidade de se produzir linhagens, inclusive híbridas, desenvolvidas a partir de um animal com fenótipo conhecido, produzido em rebanhos de uma central de seleção. Esta técnica nos bovinos traz também outras vantagens do ponto de vista de produção, já que não há necessidade de se dar um fim aos animais de sexo oposto aos que se deseja trabalhar (exemplo dos bezerros machos da raça Holandesa), uma vez que os embriões são idênticos.

O Brasil por conta do rebanho de raças zebuínas que têm, tem grande potencial para contribuir com a produção de linhagens híbridas.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com raças zebuínas. Um trabalho realizado no final da década passada demonstrou ser possível produzir indivíduos de TN a partir da fusão de células embrionárias de zebu com ovócitos enucleados de animais europeus (Meirelles et al., 2001). Este foi o primeiro relato de utilização de animais de espécie distinta na produção dos clones. Pouco depois, descendentes deste animal (cruzados) foram produzidos por transferência de núcleo utilizado uma técnica que aplicava uma fase de enucleação do ovócito diferente dos experimentos utilizados para fazer a Dolly (Bordignon e Smith, 2001). Mais recentemente, no Brasil, nasceram um animal mestiço por clonagem de células de um feto que, sem dúvida, carregava parte da genética zebu (Visintim et al., 2004, dados não publicados), o primeiro Nelore produzido por clonagem de célula somática (Yamazaki et al., 2004, dados não publicados) que veio a óbito 60 dias mais tarde, dois animais de linhagens européias (Rumpf et al., 2004) e outro animal Nelore que desta vez sobreviveu e está em ótimo estado de saúde (Visintim et al., 2004). Acreditamos que isto é prova de competência da ciência nacional. Esperamos que mediante estes estudos seja possível que o nosso país concorra de maneira igual para a manutenção das centrais de seleção e produção de linhagens bovinas.

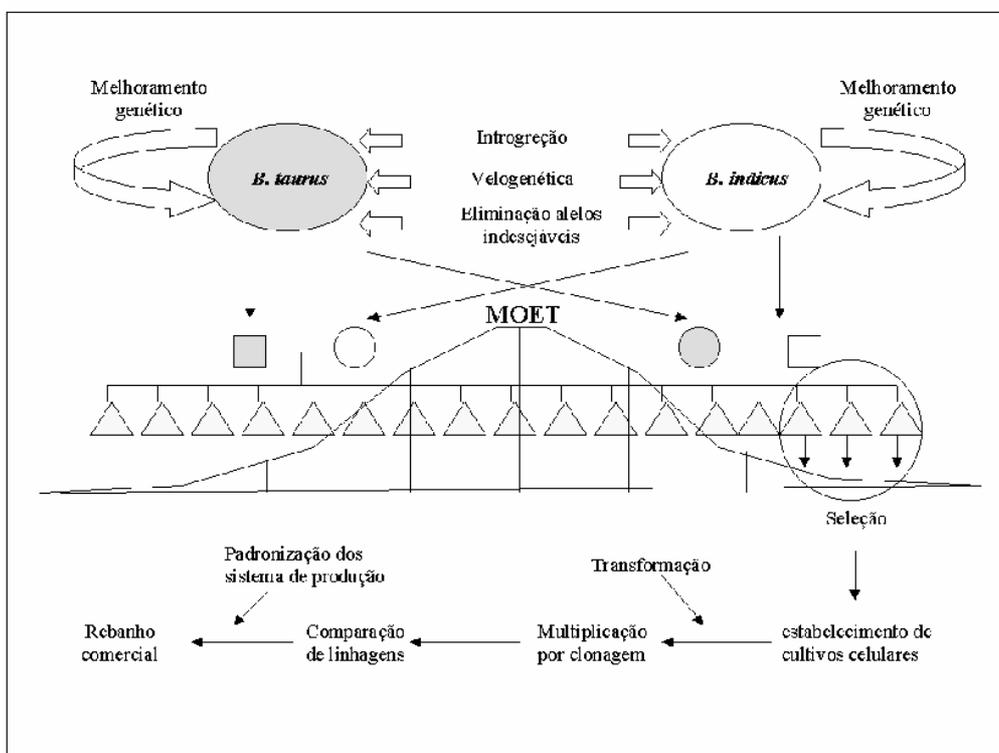


FIGURA 3. Diagrama de uma futura central de produção de linhagens de bovinos para fins comerciais. Uma central desta deve envolver criadores de rebanhos “puros”, que fazem melhoramento genético, como já existem vários. Nestes rebanhos, deverá ser aplicada a tecnologia de marcadores moleculares para selecionar alelos desejáveis e eliminar os indesejáveis. A velogenética (uso de fêmeas pré-púberes) será aplicada ativamente (principalmente com o intuito de introgridir determinados alelos desejados oriundos de outras raças). Duas espécies, *B. indicus* e *B. taurus*, por exemplo, serão aplicadas para produzir animais com o máximo de heterose. Os descendentes dos cruzamentos serão analisados em grupos MOET (podendo a FIV substituir a TE, em alguns casos). Animais superiores (estudos de simulação serão realizados para estimar o índice de seleção ideal) serão selecionados e multiplicados pela técnica da clonagem (TN). Possivelmente serão adicionados por recombinação (transgênese) outras características desejadas ao animal. Os rebanhos geneticamente idênticos (linhagens) serão comparados com relação a sua performance nos diferentes sistemas de produção. Embriões de várias linhagens serão então vendidos para os rebanhos comerciais, ou distribuídos para parceiros da indústria animal



### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A Figura 3 ilustra as possíveis aplicações de algumas biotecnias associadas às biotecnias de melhoramento genético quantitativo já em prática. Na nossa opinião, este conjunto de trabalhos deverá permitir uma maior padronização na bovinocultura, como já ocorre na suinocultura e ornitocultura. Para que este cenário seja atingido existe ainda um prazo (que pode ser relativamente longo) onde as técnicas precisam ser aprimoradas e padronizadas. Finalmente, é também necessário estudar a aceitação do mercado a este tipo de produção.

### AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto JP 99-12351-3.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRIGGS R, KING TJ. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA. v.38, p.455, 1952.
- BORDIGNON V, SMITH LC. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Molecular Reproduction Development** v. 49 n.1 p. 29-36. 1998.
- BRADLEY, D. G.; MACHUGH, D. E.; CUNNINGHAM, E. P; LOFTUS, R. T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 93, p. 5131-5135, 1996.
- CAMPBELL KH, MCWHIR J, RITCHIE WA, WILMUT I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**. v.7, n.380, p.64-66, 1996.
- CLAYTON DA. Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises. **Exp Cell Res**. v. 25, n.255, s.1, p.4-9, 2000.
- EYESTONE, W.H, Challenges and progress in the production of transgenic cattle. **Reproduction fertility and development** v.6 p. 647-652. 1994.
- INOUE K, KOHDA T, LEE J, Ogonuki N, MOCHIDA K, NOGUCHI Y, TANEMURA K, KANEKO-ISHINO T, ISHINO F, OGURA A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. **Science**. v. 295, n.5553, p.297, 2002.
- LANZA RP, CIBELLI JB, FABER D, SWEENEY RW, HENDERSON B, NEVALA W, WEST MD, WETTSTEIN PJ. Cloned cattle can be healthy and normal. **Science**. v. 294, n.5548, p.1893-1894, 2001.
- LEWIS IM, MCCLINTOCK AE, FRENCH AJ, ZUELKE KA, HARFORD BA, TROUNSON AO. Cloning and transgenesis in farm animals--an Australian perspective. **Australian Veterinary Journal**.v.78 n. 10 p. 694-697. 2000.
- LOFTUS, R. T. MACHUGH DE, BRADLEY DG, SHARP PM, CUNNINGHAM P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, p. 2757-2761, 1994.
- MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D., LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and Zebu cattle. **Genetics**, v. 146, p. 1071-1086, 1997.
- MEIRELLES, F.V.; ROSA, A. J. M; LOBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C. DUARTE, F. A. M. Is the American Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 543-547, 1999.
- MEIRELLES FV, BORDIGNON V, WATANABE Y, WATANABE M, DAYAN A, LOBO RB, GARCIA JM, SMITH LC. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. **Genetics**. v. 158 n. 1 p. 351-356. 2001.
- MEIRELLES F.V. Genômica Animal. In Genômica, 1ª edição organizado por Myr L, Editora Atheneu São Paulo p. 997-1009, 2004.
- ROBL JM, PRATHER R, BARNES F, EYESTONE W, NORTHEY D, GILLIGAN B, FIRST NL. Nuclear transplantation in bovine embryos. **J Anim Sci**. v.64, n.2, p.642-647, 1987.



- PRATHER RS, SIMS MM, FIRST NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol Reprod.** v.41, n.3, p.414-418, 1989.
- HEYMAN Y, VIGNON X, CHESNE P, LE BOURHIS D, MARCHAL J, RENARD JP. Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. **Reprod Nutr Dev.** V.38, n.6, p.595-603, 1998.
- SMITH LC, WILMUT I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. **Biol Reprod.** v.40, n.5, p.1027-1035, 1989.
- SMITH LC, BORDIGNON V, GARCIA JM, MEIRELLES FV. Mitochondrial genotype segregation and effects during mammalian development: applications to biotechnology. **Theriogenology.** v. 53 n. 1 p. 35-46. 2000.
- SMITH LC, BORDIGNON V, BABKINE M, FECTEAU G, KEEFER C..Benefits and problems with cloning animals. *Canadian Veterinary Journal.* v. 41 n. 12 p. 919-924. 2000.
- WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm. **Zygote.** v. 6, n.4, p.341-346, 1998.
- TAYLOR A, ZHANG L, HERRMANN J, WU B, KEDES L, WELLS D. Cell-cycle-specific transcription termination within the human histone H3.3 gene is correlated with specific protein-DNA interactions. **Genet Res.** v. 69, n. 2, p.101-110 , 1997.
- WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR, VIVANCO WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reprod Fertil Dev.** v.10, n.4, p.369-378, 1998.
- OBACK B, WELLS DN. Cloning cattle. **Cloning Stem Cells.** v. 5, n.4, p.243-256, 2003.
- WILLADSEN SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature.** v.320, n.6057, p.63-65, 1986.
- WILMUT, I., SCHINIENKO, A.E., MOWHIR, J., KIND, A.J., CAMPBELL, K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** v. 395 p.810-813. 1997.