



Premissas e promessas da clonagem interespecífica de espécies em risco de extinção

Premises and promises of interspecific cloning in endangered species

L.C. Magalhães, R.I.T.P. Batista, J.M.G. Souza-Fabjan, L.M. Melo, M.H. Bhat, V.J.F. Freitas¹

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Fortaleza, CE, Brasil.

¹Correspondência: vicente.freitas@uece.br

Resumo

Nos últimos anos, a transferência nuclear de células somáticas interespecífica (TNCSi) tem recebido destaque devido à possibilidade de resgatar material genético de animais extintos e de auxiliar na multiplicação de espécies em vias de extinção. No entanto, apesar dos avanços obtidos até o momento, a TNCSi ainda apresenta baixa eficiência por possuir, por exemplo, altas taxas de perdas embrionárias e mortalidade após o nascimento. Esses eventos estão relacionados com uma reprogramação anormal, que inclui a capacidade do oócito de modificar o estado de uma célula somática diferenciada para um estado de pluripotência. Assim, esta revisão tem por objetivo descrever o uso dessa biotécnica em diferentes espécies, relatar aspectos moleculares que comprometem o sucesso do desenvolvimento embrionário, bem como mostrar sua importância na medicina por meio da clonagem terapêutica.

Palavras-chave: animais silvestres, clonagem, risco de extinção, TNCSi.

Abstract

In last years, the interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer (iSCNT) has been highlighted due to the possibility of recovering genetic material of extinct animals and aid to multiplied endangered species. However, despite the progress achieved to date, the iSCNT still has low efficiency by having, for example, high rates to both embryonic loss and mortality after birth. These events are related to an abnormal reprogramming, which includes the oocyte's ability to modify the state of a differentiated somatic cell to a state of pluripotency. So this review is to describe the use of this biotechnical in different species, reporting molecular aspects that compromise the success of embryonic development as well as show their importance in medicine by therapeutic cloning.

Keywords: cloning, endangered, iSCNT, wild animals.

Introdução

A biodiversidade na terra vem sendo afetada tanto pelas alterações climáticas quanto por ações antropológicas, sendo a última a principal responsável pela extinção de diferentes espécies. Algumas estimativas demonstram que, devido às mudanças no uso da terra, até 2100 o número de espécies extintas pode variar de 0,2 a 16% (Jantz et al., 2015; Kitzes e Harte, 2015).

Em algumas espécies de mamíferos, existe uma necessidade urgente de ações de conservação por meio da aplicação de tecnologias de reprodução assistida, tais como a transferência nuclear de células somáticas ou TNCS (Priya et al., 2014). Adicionalmente, a TNCS interespecífica (TNCSi) vem surgindo como uma alternativa promissora nesses programas. Assim, esta revisão tem por objetivo descrever as premissas dessa biotécnica em espécies em risco de extinção, bem como elucidar as promessas que ela pode trazer para o sucesso do desenvolvimento embrionário.

TNCS

A TNCS consiste em transferir núcleos de células doadoras para o interior de oócitos maduros enucleados, resultando na produção de indivíduos geneticamente idênticos ao animal doador de núcleo. Essa biotécnica possui diversas etapas interligadas, as quais incluem: seleção de células receptoras (citoplastos), seleção e cultivo de células doadoras de núcleo (carioplastos), reconstrução embrionária compreendendo as etapas de fusão e ativação celular, cultivo e transferência dos embriões clones para fêmeas receptoras (Pereira e Freitas, 2009). Essa técnica apresenta diversas aplicações que vão desde estudos básicos de embriologia e placentação até os mais aplicados, como a produção de animais transgênicos (Pereira et al., 2013) e a clonagem terapêutica (Loi et al., 2016).



A TNCSi para uso em espécies de produção

A redução no número de espécies de animais ao redor de todo o mundo não envolve apenas espécies selvagens. Raças locais ou típicas de uma determinada região estão sendo substituídas por genótipos mais produtivos e, embora a proporção de raças em vias de extinção não se compare às espécies selvagens, os números absolutos são elevados (Loi et al., 2001). Dessa forma, mediante a utilização de citoplastos bovinos, já foram obtidos embriões clones de ovinos (Dominko et al., 1999), búfalos (Kitiyanant et al., 2001) e suínos (Uhm et al., 2007). Já pelo uso de citoplastos ovinos, Ma et al. (2008) descreveram a produção de blastocistos clones a partir de carioplastos caprinos.

Além disso, por meio da TNCSi, pode-se ultrapassar a relativa dificuldade existente na obtenção de oócitos da espécie a ser clonada (Abdullah et al., 2011), para que estes sejam utilizados como citoplastos no protocolo de clonagem.

A TNCSi para uso em espécies silvestres e em animais em vias de extinção

O genoma de espécies em risco de extinção pode ser reprogramado utilizando-se oócitos de animais de produção, sobretudo bovinos e suínos, que são a maior fonte de obtenção dos citoplastos (Lagutina et al., 2013). Os principais resultados obtidos nessa área estão sumarizados na Tab. 1, na qual é possível observar o sucesso da TNCSi quando aplicada em espécies de animais silvestres e em vias de extinção.

Tabela 1. Animais silvestres e ameaçados de extinção nascidos mediante o uso da TNCSi.

Espécie doadora de carioplasto	Espécie doadora de citoplasto ¹	Referência
Gauro (<i>Bos gaurus</i>) ²	Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Lanza et al., 2000
Muflão (<i>Ovis orientalis musimon</i>)	Ovino (<i>Ovis aries</i>)	Loi et al., 2001
Gato-bravo-africano (<i>Felis silvestris lybica</i>)	Gato doméstico (<i>Felis silvestris catus</i>)	Gómez et al., 2004
Lobo (<i>Canis lupus</i>)	Cão doméstico (<i>Canis domesticus</i>)	Kim et al., 2007
Gato-do-deserto (<i>Felis margarita</i>)	Gato doméstico (<i>Felis silvestris catus</i>)	Gómez et al., 2008
Búfalo-d'água (<i>Bubalus bubalis bubalis</i>)	Carabao (<i>Bubalus bubalis carabanesis</i>)	Yang et al., 2010
Gauro (<i>Bos gaurus</i>)	Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Srirattana et al., 2012

¹Em todos os casos a espécie receptora de embrião foi da mesma da doadora de citoplasto. ²Aborto aos 202 dias de gestação.

Um dos maiores avanços obtidos na TNCSi foi a clonagem do bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*), que teve sua extinção declarada quando da morte do último exemplar. Folch et al. (2009) reconstruíram embriões por fusão de células epiteliais de bucardo com oócitos de caprinos (*Capra hircus*) e obtiveram o nascimento de uma fêmea, sem anormalidades morfológicas externas. A cria apresentou insuficiência respiratória grave e morreu alguns minutos após o parto.

Um dos fortes candidatos à “ressurreição” é o mamute-lanoso (*Mammuthus primigenius*). Esse animal foi extinto há aproximadamente 10 mil anos e, para que a clonagem seja possível, é primordial a disponibilidade de tecido viável e com núcleos identificáveis. Assim, corpos congelados de mamutes encontrados na camada de terra congelada cumprem os requisitos mínimos para a TNCSi (Loi et al., 2014). Alguns projetos já propõem utilizar a TNCSi para obter embriões clones de mamute e transferir essas estruturas para elefantes, as quais levariam a termo a gestação (Fig. 1). Atualmente, apenas uma publicação de um grupo de cientistas japoneses (Kato et al., 2009) relatou a tentativa de clonar o mamute. Esses autores utilizaram células somáticas epiteliais e musculares de um filhote de mamute (Lyuba) de 15 mil anos de idade.

Fatores que afetam o desenvolvimento de embriões TNCSi

A TNCSi é mais eficiente quando as células doadoras e receptoras são de espécies estreitamente relacionadas, pois a produção natural de descendentes híbridos vivos mostra uma certa compatibilidade núcleo-citoplasma entre as duas espécies (Mastromonaco et al., 2007). Já foi demonstrado que a TNCSi inter-subespécie produz crias saudáveis. Kim et al. (2007) utilizaram citoplasto de cadela e fibroblasto de lobo e transferiram os embriões para 12 fêmeas, obtendo o nascimento de uma cria. Já Loi et al. (2001) transferiram embriões interespecíficos de muflão (*Ovis orientalis musimon*) utilizando oócitos ovinos (*Ovis aries*), tendo também obtido o nascimento de uma cria. Um clone de gauro (*Bos gaurus*) também foi obtido pelo uso de citoplastos bovinos (Srirattana et al., 2012).

Em embriões TNCSi, frequentemente é observado o bloqueio no desenvolvimento devido à distância taxonômica. Esse fato pode estar associado a diversos aspectos moleculares da reprogramação nuclear, incluindo modificações epigenéticas e mecanismos genéticos que regulam a atividade transcricional em tecidos normais e

são frequentemente mal regulados em embriões clonados (Morgan et al., 2005). Alguns desses aspectos serão apresentados a seguir.

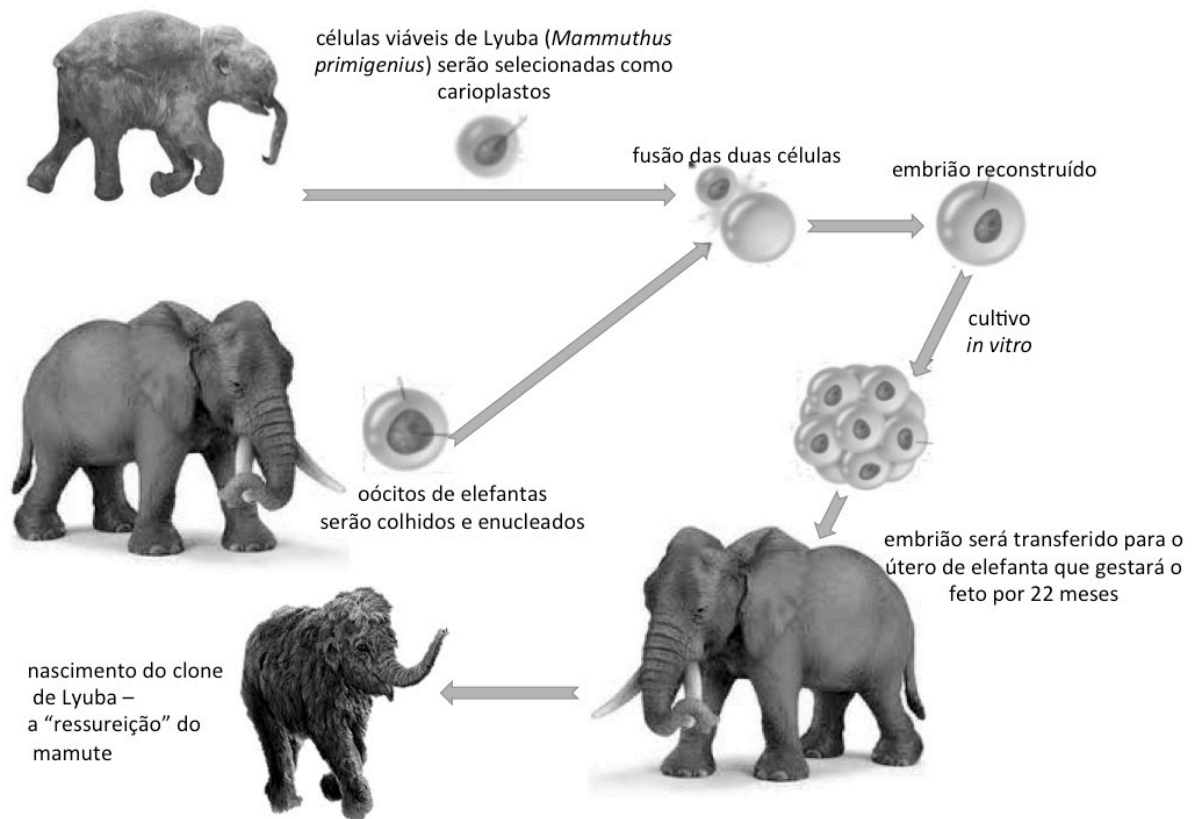


Figura 1. Esquema demonstrando a ideia de clonagem de mamute a partir de um espécime (*Lyuba*) muito bem preservado encontrado na Sibéria.

Reprogramação nuclear

A reprogramação nuclear ocorre quando há mudança de uma célula somática diferenciada para um estado pluripotente indiferenciado. Para que ela ocorra de forma eficiente, o núcleo da célula somática passa por diversas alterações epigenéticas, como a remodelação da cromatina e a desmetilação do DNA (Yang et al., 2007).

Na tentativa de se obter um estado embrionário, a cromatina da célula somática passa por importantes modificações na sua estrutura (Wilmot et al., 2002). No entanto, devido ao curto período para essa reprogramação, que vai da transferência nuclear até à ativação do genoma zigótico (Zhao et al., 2010), o padrão epigenético da célula somática doadora do núcleo pode dificultar ou até mesmo tornar inacessível o acesso dos fatores ooplasmáticos responsáveis pelo remodelamento estrutural da cromatina (Tian et al., 2009). Nesse sentido, estudos têm sido direcionados para utilização de agentes modificadores de cromatina (Wittayararat et al., 2013), os quais incluem inibidores das histonas desacetilases (HDACi) e das metiltransferases do DNA (DNMT1), objetivando melhorar a produção de embriões clones.

Além disso, a capacidade do ooplasma para remodelar fortemente o núcleo somático para uma cromatina zigótica totipotente é muitas vezes incompleta e, por isso, a reprogramação defeituosa tem sido frequentemente associada à baixa produção embrionária na clonagem (Yang et al., 2007).

Silenciamento da transcrição do núcleo doador

A análise do transcriptoma de embriões de TNCSi (macaco rhesus e bovino), na fase de oito a 16 células, demonstrou que mais de 7.700 genes somáticos tiveram a expressão diminuída (Wang et al., 2011). No entanto, houve incapacidade do oócito receptor em silenciar cerca de 860 genes somáticos do macaco rhesus. A expressão anormal de genes específicos de fibroblasto também foi encontrada, embora em menor escala, em embriões bovinos obtidos por TNCS. Esses resultados sugerem que embriões, sejam produzidos por TNCS ou por TNCSi, não podem silenciar genes específicos das células doadoras, fenômeno conhecido como memória



epigenética (Ng e Gurdon, 2005), o qual pode contribuir para falhas no desenvolvimento (Wang et al., 2011).

Ativação do genoma embrionário

Sabe-se que falhas associadas à ativação do genoma embrionário podem levar à parada no desenvolvimento do embrião e consequente insucesso da TNCSi (Jeon et al., 2016).

Porém, os dados sobre a ativação do genoma em embriões TNCSi são controversos (Wang et al., 2009, 2011). A ativação do genoma embrionário pode ser monitorada por meio da avaliação dos níveis de expressão de genes relacionados à totipotência celular, tais como *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* (Murakami et al., 2016). No entanto, genes de ativação embrionária e de pluripotência não foram capazes de prever o desenvolvimento até blastocisto de embriões produzidos por TNCSi, em que embriões interespecíficos (*Macaca fascicularis* x bovino) expressaram *OCT4* em estágio precoce, mas não se desenvolveram até 16 células (Lorthongpanich et al., 2008).

Clonagem terapêutica

A reprogramação de células somáticas para um estado embrionário, mediante o uso da transferência nuclear, despertou o interesse sobre o tema devido às possíveis aplicações significativas para a medicina humana (Egli et al., 2008). Basicamente, essas aplicações consistem no uso de células somáticas de um paciente (doador) que esteja apresentando alguma patologia. Essas células serão, então, diferenciadas *in vitro* e darão origem a células embrionárias geneticamente idênticas às do doador, as quais poderão dar origem ao tipo celular que seja indicado para o tratamento desse paciente.

No entanto, uma limitação da clonagem terapêutica é a pouca disponibilidade de oócitos humanos. Dessa forma, a utilização um citoplasto (oócito enucleado) de outra espécie que não a humana amplia a possibilidade de uso da TNCSi, além de evitar os problemas éticos advindos da necessidade de uso exclusivo de oócitos humanos para produção de embriões (Loi et al., 2016). Entretanto, mesmo diante de recentes avanços, a técnica ainda precisa ser otimizada, e outros estudos vêm sendo desenvolvidos buscando alcançar melhores resultados (Chung et al., 2015).

Considerações finais

A TNCSi, entre outras aplicações, foi proposta como uma ferramenta para possibilitar a conservação de espécies ameaçadas de extinção. Além disso, também pode ser uma técnica auxiliar na pesquisa básica, para a descoberta de genes importantes na ativação do genoma. Avanços na técnica irão simplificar os atuais procedimentos (complexos e demorados) além de incrementar os resultados obtidos até o momento.

Referências

- Abdullah RB, Wan Khadijah WE, Kwong PJ.** Comparison of intra- and interspecies nuclear transfer techniques in the production of cloned caprine embryos. *Small Rumin Res*, v.98, p.196-200, 2011.
- Chung YG, Matoba S, Liu Y, Eum JH, Lu F, Jiang W, Lee JE, Sepilian V, Cha KY, Lee DR, Zhang Y.** Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, v.17, p.758-766, 2015.
- Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL.** Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod*, v.60, p.1496-1502, 1999.
- Egli D, Birkhoff G, Eggan K.** Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.9, p.505-516, 2008.
- Folch J, Cocero M.J, Chesné P, Alabart JL, Domínguez V, Cognié Y, Roche A, Fernandez-Arias A, Martia JI, Sánchez P, Echegoyen E, Beckers JF, Sánchez Bonastre A, Vignon X.** First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v.71, p.1026-1034, 2009.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL.** Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.
- Gómez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe M, Dumas C, Lyons J, Lopez M, Dresser BL, Reiser J.** Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*, v.10, p.469-483, 2008.
- Jantz SM, Barker B, Brooks TM, Chini LP, Huang Q, Moore RM, Noel J, Hurtt GC.** Future habitat loss and extinctions driven by land-use change in biodiversity hotspots under four scenarios of climate-change mitigation. *Conserv Biol*, v.29, p.1122-1131, 2015.
- Jeon Y, Nam YH, Cheong SA, Kwak SS, Lee E, Hyun SH.** Absence of nucleolus formation in raccoon goporcine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos results in embryonic developmental failure. *J Reprod Dev*, 2016. doi: 10.1262/jrd.2015-175.



- Kato H, Anzai M, Mitani T, Morita M, Nishiyama Y, Nakao A, Kondo K, Lazarev PA, Ohtani T, Shibata Y, Iritani A.** Recovery of cell nuclei from 15,000 years old mammoth tissues and its injection into mouse enucleated matured oocytes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, v.85, p.240-247, 2009.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC.** Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.130-137, 2007.
- Kitiyant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K.** Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells*, v.3, p.97-104, 2001.
- Kitzes J, Harte J.** Predicting extinction debt from community patterns. *Ecology*, v.96, p.2127-2136, 2015.
- Lagutina I, Fulka H, Lazzari, G, Galli C.** Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems. *Cell Reprogram*, v.15, p.374-384, 2013.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P.** Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, v.2, p.79-90, 2000.
- Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A.** A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol.* 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.008>.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Jr Cappai P, Clinton M.** Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, v.19, p.962-964, 2001.
- Loi P, Saragusty J, Ptak G.** Cloning the mammoth: a complicated task or just a dream. *Adv Exp Med Biol*, v.753, p.489-502, 2014.
- Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Chan AW, Ketu-dat-Cairns M, Parnpai R.** Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocytes. *J Reprod Dev*, v.54, p.306-313, 2008.
- Ma LB, Yang L, Hua S, Cao JW, Li JX, Zhang Y.** Development in vitro and mitochondrial fate of interspecies cloned embryos. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.279-285, 2008.
- Mastro Monaco GF, Favetta LA, Smith LC, Filion F, King WA.** The influence of nuclear content on developmental competence of gaur cattle hybrid in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, v.76, p.514-523, 2007.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W.** Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, v.14, p.47-58, 2005.
- Murakami K, Günesdogan U, Zyllicz JJ, Tang WWC, Sengupta R, Kobayashi T, Kim S, Butler R, Dietmann S, Surani MA.** NANOG alone induces germ cells in primed epiblast in vitro by activation of enhancers. *Nature*. v.529, p.403-529, 2016.
- Ng RK, Gurdon JB.** Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. *Cell Cycle*, v.4, p.760-763, 2005.
- Pereira AF, Feltrin C, Almeida KC, Carneiro IS, Avelar SRG, Alcântara Neto AS, Sousa FC, Melo CHS, Moura RR, Teixeira DIA, Bertolini LR, Freitas VJF, Bertolini M.** Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Rum Res*, v.109, p.163-172, 2013.
- Pereira AF, Freitas VJF.** Clonagem em ruminantes: progresso e perspectivas atuais. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.118-128, 2009.
- Priya D, Selokar NL, Raja AK, Saini M, Sahare AA, Nala N, Palta P, Chauhan MS, Manik RS, Singla SK.** Production of wild buffalo (*Bubalus arnee*) embryos by interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.343-351, 2014.
- Srirattana K, Imsoonthornruksa S, Laowtammathron C, Sangmalee A, Tunwattana W, Thongprapai T, Chaimongkol C, Ketudat-Cairns M, Parnpai R.** Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin A treatment. *Cell Reprogram*, v.14, p. 248-257, 2012.
- Tian XC, Park J, Bruno R, French R, Jiang L, Prather RS.** Altered gene expression in cloned piglets. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.60-66, 2009.
- Uhm SJ, Gupta MK, Kim T, Lee HT.** Expression of enhanced green fluorescent protein in porcine- and bovine cloned embryos following interspecies somatic cell nuclear transfer of fibroblasts transfected by retrovirus vector. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.1538-1547, 2007.
- Wang K, Beyhan Z, Rodriguez RM, Ross PJ, Iager AE, Kaiser GG, Chen Y, Cibelli JB.** Bovine ooplasm partially remodels primate somatic nuclei following somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, v.11, p.187-202, 2009.
- Wang K, Otu HH, Chen Y, Lee Y, Latham K, Cibelli JB.** Reprogrammed transcriptome in rhesus-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos. *PLoS One*, v.6, p.e22197, 2011.
- Wilmut I, Beaujean N, De Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE.** Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, v.419, p.583-586, 2002.
- Wittayarat M, Sato Y, Do LTK, Morita Y, Chatdarong K, Techakumphu M, Taniguchi M, Otoi T.** Histone deacetylase inhibitor improves the development and acetylation levels of cat-cow interspecies cloned embryos. *Cell Reprogram*, v.15, p.301-308, 2013.
- Yang CY, Li RC, Pang CY, Yang BZ, Qin GS, Chen MT, Zhang XF, Huang FX, Zheng HY, Huang YJ,**



Liang XW. Study on the inter-subspecies nuclear transfer of river buffalo somatic cell nuclei into swamp buffalo oocyte cytoplasm. *Anim Reprod Sci*, v. 121, p.78-83, 2010.

Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, v.39, p.295-302, 2007.

Zhao J, Hao Y, Ross JW, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS. Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram*, v.12, p.75-83, 2010.
