



Aplicações da clonagem e transgênese em pequenos ruminantes *Cloning and transgenesis applied to small ruminants*

Vicente José de Figueirêdo Freitas¹, Luciana Magalhães Melo, Dárcio Ítalo Alves Teixeira

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

¹Correspondência: vicente.freitas@uece.br

Abstract

Transgenic animals are those animals which are genetically modified. A foreign gene is inserted into these animals to see certain characteristics. These animals can be helpful in producing organs, growth hormones and useful proteins for the humans. Transgenic farm animals were first developed in 1985 and were useful in the production of biopharmaceuticals shortly thereafter. The ideal transgenic animal produces plenty of milk, and has relatively short generation times. Thus, small ruminants have been selected for a number of reasons, the chief of which is the short generational time of 18 months. Thus, this review aims to present the characteristics and main applications of transgenesis and cloning in small ruminants.

Keywords: goats, sheep, transgenesis, somatic cell nuclear transfer.

Introdução

Entre todas as modernas biotécnicas ligadas à reprodução ou produção animal, a transgênese e a Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) ou clonagem têm, nas últimas décadas, representado um dos alicerces de maior destaque frente à comunidade científica. Tais técnicas apresentam inúmeras aplicações e podem, em associação, se tornarem as protagonistas dos maiores avanços na área de terapia gênica e na produção de proteínas para uso em novas alternativas de tratamentos em saúde humana.

De maneira geral, a transgênese consiste na modificação da informação genética de um organismo através de técnicas de DNA recombinante pela inserção ou silenciamento de genes específicos (Houdebine, 2003). Por sua vez, a clonagem consiste em transferir núcleos de células doadoras para o interior de um citoplasma receptor (citoplasto), resultando na produção de indivíduos geneticamente idênticos denominados clones. Sucintamente, a clonagem possui duas principais etapas: a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasto após o processo de enucleação, enquanto a segunda consiste na reconstrução do embrião utilizando esse citoplasto e o núcleo de células (carioplasto) de um animal de interesse para, posteriormente, realizar a transferência para uma receptora (Pereira e Freitas, 2009).

Para ambas as técnicas, caprinos (sobretudo) e ovinos são espécies interessantes para uso como modelo, pois apresentam uma série de características vantajosas, tais como: produção leiteira interessante, curto intervalo de gerações e menores custos de manutenção, quando comparados aos bovinos, por exemplo. Assim, essa revisão apresenta as principais aplicações da transgênese e clonagem em pequenos ruminantes, com ênfase nos resultados obtidos no Brasil.

Métodos de obtenção de pequenos ruminantes transgênicos

Muitos foram os métodos desenvolvidos para a transferência de genes de interesse em animais de produção, sendo que os mais comuns para pequenos ruminantes são a microinjeção pró-nuclear de DNA exógeno em zigotos (Hammer et al., 1985) ou a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ou embrionárias previamente modificadas geneticamente (Ebert et al., 1991). Essas duas técnicas estão apresentadas esquematicamente na Fig. 1.

Além dessas técnicas, existem várias outras que podem produzir animais geneticamente modificados, como por exemplo: transgênese mediada por lentivírus, sistema transposons, RNA de interferência (RNAi), recombinações sítio-específico, transferência gênica mediada por espermatozoides, endonucleases e nucleases dedo-de-zinco. No entanto, nenhuma delas chegou a produzir pequenos ruminantes transgênicos.

Além dessas técnicas, recentemente, a tecnologia de CRISPR/Cas9 foi utilizada com sucesso na obtenção de ovinos knockout para o gene da miostatina (Crispo et al., 2015) e de caprinos, também knockout para quatro genes (Ni et al., 2014).

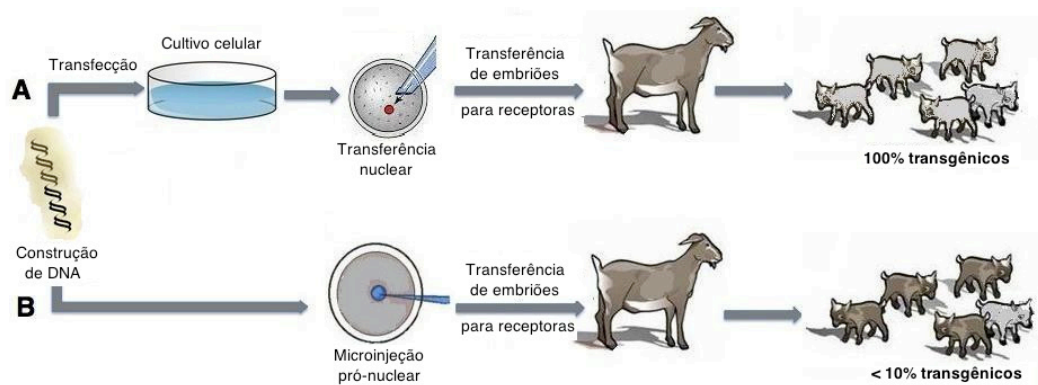


Figura 1. Produção de animais transgênicos por Transferência Nuclear de Células Somáticas - TNCS (A) ou por microinjeção em embriões pró-nucleares (B).

Aplicações da transgênese e clonagem em pequenos ruminantes

Desde o nascimento dos primeiros animais clones e transgênicos, algumas aplicações da transgênese e clonagem puderam ser estabelecidas em diferentes setores científicos e de produção. Em pequenos ruminantes, algumas aplicações merecem destaque, tais como: (i) produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico, (ii) melhoramento genético animal e (iii) conservação e recuperação de recursos genéticos de animais ameaçados de extinção.

Produção de proteínas recombinantes

No cenário de produção de animais biorreatores, é coerente afirmar que a aplicação real da clonagem em pequenos ruminantes é a produção de animais transgênicos. A TNCS tem seu papel tanto na produção de animais transgênicos pela obtenção de animais fundadores a partir da utilização de linhagens celulares que receberam genes específicos (Baguisi et al., 1999), como para a multiplicação de transgênicos fundadores (Reggio et al., 2001). A produção de proteínas recombinantes no leite desses animais tem atraído interesse pela grande capacidade de síntese da glândula mamária. Tais animais são capazes de produzir proteínas recombinantes de maneira mais eficiente do que os sistemas baseados em microrganismos ou células animais.

Nesse contexto, as cabras oferecem uma vantagem significativa em relação a ovelhas, visto que, na maioria das vezes, são mais eficientes na produção de leite. Outro fator a ser considerado é o custo da produção de um animal transgênico, pois estima-se que para produzir uma vaca transgênica por microinjeção pró-nuclear são necessários US\$ 546.000, enquanto este custo cai para US\$ 60.000 na produção de uma cabra ou ovelha transgênica. Várias proteínas recombinantes já foram expressas no leite de cabras e ovelhas transgênicas e algumas destas proteínas se encontram na fase de testes clínicos. Destaca-se a Antitrombina humana, produzida por caprinos transgênicos, por ter sido a primeira proteína recombinante de origem animal liberada como medicamento para uso clínico em humanos (Schimidt, 2006; Kling, 2009). No Brasil, com essa aplicação, merecem destaque os caprinos transgênicos obtidos por Freitas et al. (2012) para o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humanos (hG-CSF) e por Tavares et al. (2016) para a Glucoceribrosidase. No caso dos caprinos transgênicos para o hG-CSF, estudos já demonstraram a produção da proteína recombinante, após lactação induzida, em níveis compatíveis com a produção industrial (Moura et al., 2013).

Melhoramento genético

Quanto à utilização de animais transgênicos para a melhoria do rebanho em pequenos ruminantes, alguns relatos são disponíveis, como por exemplo, o aumento da produção de lã em ovelhas, expressando uma construção de IGF-queratina em folículos de lã (Damak et al., 1996).

A utilização das biotécnicas de transgênese e TNCS para melhorar características de valor econômico, tais como aumento na produção de leite, carne e/ou outros produtos ainda não foi relatado em caprinos. Enquanto a oportunidade para tais aplicações é visualizada somente em um futuro próximo, é improvável que seu uso frequente ocorra antes de uma melhoria dramática na eficiência técnica e nos custos de produção de caprinos transgênicos e clonados.

Conservação e recuperação de recursos genéticos

Uma aplicação interessante da clonagem em pequenos ruminantes é seu uso na conservação dos recursos genéticos em risco de extinção. Até o momento, os melhores exemplos da utilização desta aplicação é o



seu uso em animais não domésticos dos gêneros *Ovis* e *Capra*.

Loi et al. (2001) obtiveram o nascimento de um ovino selvagem (muflão) por clonagem. Nesse estudo, os autores utilizaram oócitos recuperados de ovinos domésticos (*Ovis aries*) e células da granulosa oriundas de duas fêmeas de muflão encontradas mortas. Tais resultados estimulam o uso da clonagem para a expansão de populações criticamente ameaçadas de extinção, tanto dentro de um programa de conservação e em situações extremas envolvendo a morte súbita.

No gênero *Capra*, dois importantes relatos merecem destaque. Primeiramente, um grupo da China obteve os primeiros blastocistos clones de íbex (*Capra ibex*) utilizando oócitos de cabras domésticas (Wang et al., 2007). Posteriormente, e talvez o mais importante relato do uso da clonagem na conservação da biodiversidade, ocorreu com o nascimento de um animal de uma subespécie já extinta (*Capra pyrenaica pyrenaica*). Para tanto, os autores utilizaram também oócitos de caprinos domésticos e fibroblastos do último espécime da espécie, uma fêmea, cujas células foram criopreservadas em 1999, um ano antes de sua morte. Os embriões produzidos foram transferidos para receptoras sincronizadas (fêmeas resultado do cruzamento de machos íbex com cabras domésticas). Ocorreu o nascimento da fêmea clone, contudo este animal morreu alguns minutos depois em virtude de problemas pulmonares (Folch et al., 2009).

Conclusões

A clonagem em pequenos ruminantes é ainda uma biotécnica em fase de pesquisa porém com grandes perspectivas para o futuro. No que se refere à transgênese, os pequenos ruminantes, em especial a espécie caprina, tornaram-se um padrão mundial de referência na produção de animais biorreatores, devido às qualidades inerentes às duas espécies e de interesse na indústria de produção de proteínas recombinantes com interesse farmacêutico.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq, FUNCAP e CAPES pelo apoio financeiro fornecido para os diversos experimentos.

Referências

- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A.** Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, v.10, e0136690, 2015.
- Damak S, JAY NP, Barrel GK, Bullock DW** Targeting gene expression to the woll follicle in transgenic sheep. *Nat Biotechnol*, v.14, p.181-184, 1996.
- Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Dominguez V, Cognié Y, Roche A, Fernández A, Martí 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.
- Freitas VJF, Serova IA, Moura R, Andreeva IE, Melo LM, Teixeira DIA, Pereira AF, Lopes Junior ES, Dias LPD, Nunes Pinheiro DCS, Sousa FC, Alcântara Neto AS, Albuquerque ES, Melo CHS, Rodrigues VHV, BatistaRITP, Dvoryanchikov GA, Serov OL.** The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*, v.105, p.105-113, 2012.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL.** Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, v.315, p.680-683, 1985.
- Houdebine LM.** From the gene to the transgenic animal. In: HOUDEBINE, L.M. *Animal Transgenesis and Cloning*. West Sussex: Wiley, 2003, p. 1-32.
- Kling J.** First US approval for a transgenic animal drug. *Nat Biotechnol*, v.27, p.302-303, 2009.
- 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.
- Moura RR, Albuquerque ES, Melo CH, Alcântara-Neto AS, Batista RITP, Nunes-Pinheiro DC, Pereira AF, Teixeira DIA, Melo LM, serova IA, Andreeva LE, Serov OL, Freitas VJF.** Dynamics of recombinant hG-CSF in transgenic goat: preliminary study in the founder during hormonally induced lactation. *Anim Biotechnol*, v.24, p.10-14, 2013.
- Pereira AF, Freitas VJF.** Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, p.118-128, 2009.
- Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C.** Efficient gene knockout in goats



using CRISPR/Cas9 system. PLoS One, v.9, e106718, 2014.

Reggio BC, James AN, Green HI, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y, Godke RA. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and non-stimulated abattoir-derived ovaries. Biol Reprod, v.65, p.1528-1533, 2001.

Schmidt C. Belated approval of first recombinant protein from animal. Nature Biotechnology, v.4, p.877, 2006.

Tavares KC, Dias AC, Lazzarotto CR, Gaudencio Neto S, de Sá Carneiro I, Ongaratto FL, Pinto AF, de Aguiar LH, Calderón CE, Toledo JR, Castro FO, Santos DS, Chies JM, Bertolini M, Bertolini LR. Transient expression of functional glucocerebrosidase for treatment of gaucher's disease in the goat mammary gland. Mol Biotechnol, v.58, p.47-55, 2016.

Wang L, Peng T, Zhuh H, LV Z, Liu T, Shuai Z, Gao H, Cai T, Cao X, Wang H. In vitro development of reconstructed ibex (*Capra ibex*) embryos by nuclear transfer using goat (*Capra hircus*) oocytes. Theriogenology, v.73, p.135-141, 2007.
