



Transferência Nuclear de Células Somáticas interespecífica (TNCSi) na conservação de cervídeos em risco de extinção

Interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer (TNCSi) in the conservation of endangered species of deer

Vicente José de Figueirêdo Freitas¹, Luciana Magalhães Melo^{1,2}, Livia Correia Magalhães¹, José Maurício Barbanti Duarte³

Faculdade de Veterinária¹, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

Unidade de Pesquisa em Genética Molecular², Centro Universitário FAMETRO, Fortaleza, CE, Brasil.

Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos³, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

Resumo

A Transferência Nuclear de Células Somáticas interespecífica (TNCSi) envolve a transferência de um núcleo ou célula de uma espécie para o citoplasma de um oócito enucleado de outra espécie. Após ativação, os complexos carioplasto-citoplasma reconstruídos podem ser cultivados *in vitro* até o blastocisto, o estágio final de desenvolvimento pré-implantação. Esta pode ser uma estratégia interessante na tentativa de conservação de espécies em risco de extinção. Esta revisão tem por objetivo apresentar alguns detalhes da técnica e relatar a experiência de nosso grupo usando como modelo o veado-catingueiro.

Palavras-chave: clonagem, veado-catingueiro, caprino, bovino.

Abstract

*Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer (iSCNT) involves the transfer of a nucleus or cell from one species into the cytoplasm of an enucleated oocyte from another. Once activated, reconstructed caryoplast-cytoplasm complexes can be cultured *in vitro* to blastocyst, the final stage of preimplantation development. This may be an interesting strategy in attempting to conserve endangered species. The objective of this review is to present some details of the technique and to report the experience of our group using as model the brown brocket deer.*

Keywords: cloning, brown brocket deer, goat, cattle.

Introdução

A demonstração de que o genoma de uma célula de mamífero, totalmente diferenciada, poderia ser restaurado para uma completa totipotência completa, através do nascimento da ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997) forneceu um forte impulso à área de reprogramação celular. Na sequência desse evento marcante, várias espécies de mamíferos foram clonadas a partir de diferentes tipos de celulares, demonstrando que o genoma mamífero completamente diferenciado poderia ser revertido para um estágio embrionário, embora com baixa eficiência, através do processo definido como Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS).

Desde os objetivos iniciais de pecuaristas em formar seus rebanhos com animais de genótipo superior ou para conservação de raças, associado à sua baixa eficiência e fracassos peculiares, a TNCS tornou-se um importante tema de pesquisa de mecanismos biológicos básicos da diferenciação do genoma e uma ferramenta para produzir células tronco embrionárias para posterior uso em medicina regenerativa (Pan et al., 2012).

A disponibilidade de oócitos e a tecnologia relacionada de maturação e cultivo *in vitro* são fundamentais para o sucesso da reprogramação celular por TNCS. Espécies de produção (principalmente bovinos e suínos) têm sido a principal fonte de oócitos de alta qualidade para maturação *in vitro* e posterior TNCS (Galli e Lazzari, 2008). Os eventos necessários para que ocorra a reprogramação nuclear são vários e complexos, e a verificação de sua ocorrência tem um elevado rigor à medida que o desenvolvimento progride da ativação oocitária até o completo desenvolvimento (Oback, 2009). A TNCS interespecífica (TNCSi) pode ser uma maneira para clonagem de espécies em risco de extinção, ou mesmo extintas. Esta técnica fornece um caso extremo de falha na reprogramação, a partir do qual muito

¹Correspondência: vicente.freitas@uece.br

Recebido: 17 de julho de 2019

Aceito: 21 de março de 2020



pode ser entendido em relação os mecanismos biológicos básicos subjacentes à reprogramação do genoma.

Este artigo de revisão tenta analisar alguns aspectos da TNCSi e descreve, em especial, os resultados obtidos por nosso grupo usando o veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) como modelo animal.

Reprogramação Nuclear

A eficiência da TNCS ainda é baixa, com menos de 10% crias vivas ao final do processo (Lagutina et al., 2005). A reduzida eficiência resulta da falha do oócito em restaurar o estado totipotente do núcleo transferido através de um processo definido como “reprogramação nuclear” (Meissner e Jaenisch, 2006). A completa reprogramação compatível com o desenvolvimento a termo é alcançada em uma minoria dos embriões clonados, enquanto uma grande proporção deles apresenta desregulação epigenética e expressão gênica anormal nas fases pré e pós-implantação (Sawai, 2009). Muitas das tentativas para melhorar os resultados da TNCS tiveram efeitos limitados, com a exceção do uso de agentes remodeladores da cromatina (Tricostatina A) ou o uso de células-tronco embrionárias como núcleo doador (Luo et al., 2013; Xie et al., 2014).

Uma das possibilidades de melhorar a reprogramação nuclear advém dos constantes avanços no conhecimento sobre a pluripotência. Assim, alguns estudos já foram realizados em células com pluripotência induzida (iPS) indicando um papel essencial do gene supressor tumoral p53 para reprogramação nuclear (Kawamura et al., 2009). Esse estudo sugere que o silenciamento de p53 em células somáticas antes da TNCS pode resultar em melhor reprogramação. Além disso, outros artigos de revisão abordaram o referido tema (Loi et al., 2011; Matoba e Zhang, 2018).

Incompatibilidade entre DNA mitocondrial e genômico

O DNA mitocondrial (DNAMt) codifica algumas das subunidades da cadeia de transferência de elétrons responsável pela produção de ATP. Adicionalmente, fatores necessários para replicação, transcrição e tradução do DNAMt codificados pelo DNA nuclear e, portanto, uma coordenação entre DNAMt e genômico é essencial para o desenvolvimento do embrião. Assim, a TNCSi já foi realizada com sucesso entre bovino/gauro (Lanza et al., 2000) e ovino/muflão (Loi et al., 2001), espécies que são intimamente relacionadas entre si. A importância da compatibilidade entre o DNA nuclear e mitocondrial para o desenvolvimento do embrião clone já foi também exposto em experimentos com TNCS demonstrando que certos haplótipos de DNAMt fortalecem o desenvolvimento embrionário (Loi et al., 2011).

Problemas na ativação do genoma embrionário

O novo genoma estabelecido após a fecundação começa a tornar-se transcricionalmente ativo em diferentes estádios embrionários, de acordo com a espécie. Fatores de transcrição maternalmente expressos, acumulados e armazenados no citoplasma do oócito, são responsáveis pela ativação do genoma embrionário (Hu et al., 2010). Experimentos iniciais com TNCSi entre diferentes gêneros (bovino/suíno e ovino/suíno) mostraram que o genoma transferido não foi transcrito corretamente no citoplasma hospedeiro, levando à parada no desenvolvimento embrionário (Fulka et al., 2008). No entanto, os avanços obtidos nos estudos mais recentes sobre a ativação do genoma embrionário demonstraram ser muito úteis para a TNCSi. Desde que sejam identificadas as sequências completas dos principais genes envolvidos, os genes podem ser microinjetados no núcleo externo para promover a transição materno/zigótica em embriões oriundos de TNCSi.

A questão crucial que acreditamos ser de maior importância, mas é raramente mencionada, trata da disponibilidade de receptoras para embriões obtidos por TNCSi. A disponibilidade de fêmeas para serem usadas como receptoras dentro da população de uma espécie em risco de extinção é certamente limitada. Na TNCSi, a genética da receptora de embriões pode ser um obstáculo ainda mais importante que a incompatibilidade entre o DNA mitocondrial e genômico ou mesmo a ativação do genoma embrionário. Portanto, a diminuição dos limites entre espécies antes da transferência de embriões é um requisito fundamental para o sucesso da multiplicação de genótipos ameaçados. No entanto, muito pouco tem sido realizado nesse sentido, e muito desses estudos tem se concentrado em embriões interespecíficos de equinos e bovinos (Loi et al., 2011).



Uso da TNCSi em espécies de produção e silvestres

A redução no número de espécies de animais ao redor de todo o mundo não envolve apenas espécies silvestres. Raças locais de várias regiões estão sendo substituídas por genótipos mais produtivos e, embora a proporção de raças em vias de extinção não se compare às espécies silvestres, os números absolutos são elevados (Loi et al., 2001). Com o uso 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.

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. 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. Alguns exemplos de animais silvestres, ameaçados de extinção, nascidos pelo uso da TNCSi.

Doador de carioplasto	Doador 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
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
Gauro (<i>Bos gaurus</i>)	Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Srirattana et al., 2012

¹A espécie receptora de embrião foi a mesma da doadora de citoplasto. ²Aborto aos 202 dias de prenhez.

No entanto, uma das maiores conquistas obtidas 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.

O estudo em cervídeos

Há alguns anos, nosso grupo na Universidade Estadual do Ceará (UECE), iniciou uma parceria com o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) no intuito de realizar estudos com o veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) para o uso da TNCSi como ferramenta de conservação da espécie, como também usar a mesma como modelo para outras espécies de cervídeo com real risco de extinção, como por exemplo, o cervo do pantanal (*Blastocercus dichotomus*) e veado bororó-do-sul (*Mazama nana*).

O veado-catingueiro apresenta uma grande plasticidade ecológica, ocorrendo em todos os biomas do Brasil, com exceção da bacia amazônica (Black-Décima et al., 2010) e está classificada na Lista Vermelha da IUCN (2016) como uma espécie que não sofre ameaça imediata à sobrevivência. Assim, nesse estudo, tivemos como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões clones de veado-catingueiro produzidos por TNCSi utilizando citoplastos bovinos e caprinos.

A partir de uma biópsia de pele de um exemplar de veado-catingueiro, foi realizado cultivo de fibroblastos e criopreservação para posterior uso. Paralelamente, foram obtidos ovários caprinos e bovinos para colheita de oócitos por punção folicular. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em meio TCM199 suplementado e de acordo com a origem do oócito. As condições de MIV foram 5% de CO₂ a 38,5°C por 20-21 h. Posteriormente foram realizadas as etapas de enucleação oocitária, transferência nuclear e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões reconstruídos. As condições de CIV foram em mistura de gases (5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂) a 38,5°C durante sete dias.

Ao total foram reconstruídos 37 e 438 embriões, quando utilizados oócitos caprinos e bovinos, respectivamente. Quando do uso de oócitos caprinos, os embriões clones atingiram o estágio de mórula (Fig. 1A) e não houve diferença estatística quando comparado os pares (carioplastos/citoplasto) caprino/caprino (40%) e veado/caprino (50%). Já quando do uso de oócitos oriundos de bovinos, os embriões atingiram o estágio de blastocisto (Fig. 1B), porém sem diferença estatística entre os pares bovino/bovino (11,3%) e veado/bovino (5,9%).

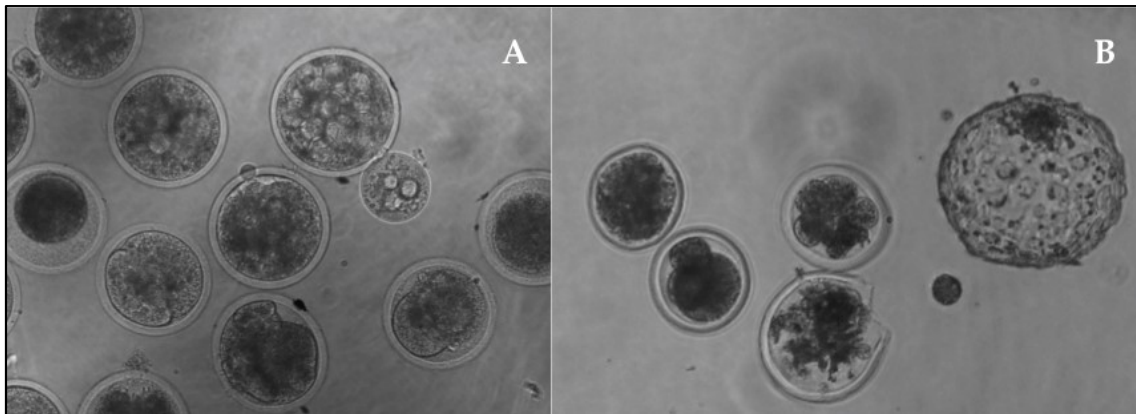


Figura 1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões clones de veado-catingueiro utilizando oócitos caprinos (A) ou bovinos (B).

Considerações finais

Nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, a obtenção de embriões produzidos por TNCSi usando carioplasto (fibroblasto) de veado-catingueiro. Os resultados indicam que tanto oócitos caprinos quanto bovinos foram capazes de reprogramar as células somáticas, e que os embriões resultantes foram capazes de se desenvolver até o estágio de mórula e blastocisto, respectivamente. O sucesso desta técnica demonstra o tremendo potencial para seu uso na conservação e disseminação da diversidade genética em populações pequenas e fragmentadas de espécies raras de cervídeos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fazenda Haras Claro, por permitir a biópsia auricular em seus animais, e aos seguintes órgãos de fomento: CNPq (processo nº 461330/2014-8), FUNCAP (processo nº CI3-0093-0005580100/14) e CAPES/COFECUB (processo nº 88881.142966/2017-01), através dos quais foi possível a realização dos experimentos que forneceram parte dos resultados apresentados nesta revisão.

Referências

- Black-Décima P, Rossi RV, Vogliotti A, Cartes JL, Maffei L, Duarte JMB, González S, Júlia JP.** Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: Duarte JMB, González S. Neotropical cervidology. Jaboticabal: FUNEP, p.119-132, 2010
- 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.
- 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.
- Fulka J Jr, Fulka H, St John, J, Galli C, Lazzari G, Lagutina I, Fulka J, Loi P.** Cybrid human embryos - warranting opportunities to augment embryonic stem cells research. *Trends Biotechnol*, v.26, p.469-474, 2008.
- Galli C, Lazzari G.** The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.1-7, 2008.
- 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.
- Hu J, Wang F, Zhu X, Yuan Y, Ding M, Gao S.** Mouse ZAR1-like (XM_359149) colocalizes with mRNA processing components and its dominant-negative mutant caused two-cell stage embryonic arrest. *Dev Dyn*, v.239, p.407-424, 2010.



- IUCN. The IUCN red list of threatened species. 2016. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>
- Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Belmonte JC.** Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, v.460, p.1140-1144, 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.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Ponderato N, Turini P, Crotti G, Galli C.** Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, v.130, p.559-567, 2005.
- 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, Ptak G, 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, Modlinski JA, Ptak G.** Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology*, v.76, p.217-228, 2011.
- Luo C, Lu F, Wang X, Wang Z, Li X, Gong F, Jiang J, Liu Q, Shi D.** Treatment of donor cells with trichostatin A improves in vitro development and reprogramming of buffalo (*Bubalus bubalis*) nucleus transfer embryos. *Theriogenology*, v.80, p.878-886, 2013.
- 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.
- Matoba S, Zhang Y.** Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications. *Cell Stem Cell*, S1934-5909, p.30300-X, 2018.
- Meissner A, Jaenisch R.** Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn*, v.235, p.2460-2469, 2006.
- Oback B.** Cloning from stem cells: Different lineages, different species, same story. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.83-94, 2009.
- Pan G, Wang T, Yao H, Pei D.** Somatic cell reprogramming for regenerative medicine: SCNT vs. iPS cells. *Bioessays*, v.34, p.472-476, 2012.
- Sawai K.** Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev*, v.55, p.11-16, 2009.
- Srirattana K, Imsoonthornrukka 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.
- 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.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Xie B, Wang J, Liu S, Wang J, Xue B, Li J, Wei R, Zhao Y, Liu Z.** Positive correlation between the efficiency of induced pluripotent stem cells and the development rate of nuclear transfer embryos when the same porcine embryonic fibroblast lines are used as donor cells. *Cell Reprogram*, v.16, p.206-214, 2014.
-