



Transgênese e clonagem adotadas como biotécnicas reprodutivas em pequenos ruminantes

Transgenesis and cloning as reproductive biotechniques in small ruminants

Vicente José de Figueirêdo Freitas¹, Luciana Magalhães Melo², Maiana da Silva Chaves¹, Dárcio Ítalo Alves Teixeira¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, 60714-903, Fortaleza-CE, Brasil

²Centro Universitário FAMETRO, Rua Conselheiro Estelita 500, 60010-260, Fortaleza- CE, Brasil

Resumo

Ovinos e caprinos são espécies que devido ao seu tamanho adequado, curto período gestacional e produção leiteira, tornaram-se importantes modelos na pesquisa pecuária, farmacêutica e biomédica. Assim, a engenharia genética tem sido amplamente aplicada à pesquisa com pequenos ruminantes. Caprinos e ovinos modificados geneticamente fornecem modelos valiosos para pesquisa sobre as funções dos genes, melhorando a exploração, obtendo produtos farmacêuticos no leite e aumentando a resistência às doenças. Além disso, o uso conjunto da clonagem e transgênese já foi responsável por marcos importantes na biotecnologia animal. Esta revisão destaca os avanços da clonagem e da engenharia genética nessas espécies obtidos nas últimas quatro décadas, com ênfase nas pesquisas realizadas no Brasil.

Palavras-chave: Caprinos, Ovinos, Transferência Nuclear de Células Somáticas, Modificado Geneticamente.

Abstract

Sheep and goats are valuable species that due to their suitable size, short pregnancy period, and secretion of milk, have become important model in agricultural, pharmaceutical, and biomedical research. Thus, genome engineering has been widely applied to sheep and goat research. Gene-edited sheep and goats provide valuable models for investigations on gene functions, improving animal breeding, producing pharmaceuticals in milk and improving disease resistance. Additionally, the joint use of cloning and transgenesis has already been responsible for major milestones in animal biotechnology. This review highlights the advances of cloning and genome engineering in these species over the past four decades with particular emphasis on research in Brazil.

Key words: Goats, Sheep, Somatic Cell Nuclear Transfer, Genetically Modified.

Introdução

Nos últimos anos, a criação de animais de produção passou por grandes mudanças devido ao desenvolvimento e refinamento das técnicas de reprodução assistida, as quais permitiram a melhoria na produção quanti-qualitativa de embriões, especialmente *in vitro* e em diferentes espécies, incluindo os pequenos ruminantes (Souza-Fabjan et al., 2021). Esta mudança dramática está revolucionando as abordagens convencionais de melhoramento e as estruturas envolvidas, incluindo o papel dos criadores. Adicionalmente, o uso da seleção genômica foi possibilitado pelo desenvolvimento da biologia molecular e bioinformática que permitiram o sequenciamento do genoma de uma maneira mais eficiente e barata (Bickhart et al. 2020).

Em pequenos ruminantes, duas biotécnicas se destacam pelo avanço já alcançado, as possibilidades de uso futuro e por sua importância para a saúde humana e animal. Assim, a transgênese e a clonagem podem associar suas características peculiares e contribuir para alcançar este avanço (Piedrahita e Mir, 2004). Portanto, esta revisão tem por objetivo apresentar os avanços da clonagem e da transgênese em pequenos ruminantes obtidos nas últimas quatro décadas, com ênfase nas pesquisas realizadas no Brasil.

¹Correspondência: vicente.freitas@uece.br

Recebido: 16 de setembro de 2021

Aceito: 09 de novembro de 2021

Transgênese

Um animal transgênico é um animal geneticamente modificado possuindo material genético obtido através da tecnologia do DNA recombinante. Desde a obtenção dos primeiros mamíferos transgênicos (Hammer *et al.*, 1985), o número de animais geneticamente modificados aumentou rapidamente (Niemann e Kues, 2007; Kues e Niemann, 2011). A primeira técnica a ter sucesso em produzir pequenos ruminantes transgênicos foi a microinjeção de uma construção de DNA no pronúcleo de embriões recém-fecundados. Dessa forma, Ebert *et al.* (1991) descreveram a primeira produção bem-sucedida de cabras transgênicas expressando uma proteína heteróloga em seu leite. A produção de uma variante do ativador de plasminogênio tecidual humano foi verificado no leite de duas cabras leiteiras transgênicas, dentre 29 nascidas. Uma delas foi acasalado e levou a gestação a termo. Durante a lactação, foi possível isolar a proteína humana enzimaticamente ativa na concentração de 3 µg/ml de leite.

O grupo na Universidade Estadual do Ceará (UECE) foi o pioneiro no Brasil na produção de caprinos transgênicos trabalhando com uma construção de DNA para obtenção de animais portanto o gene do fator estimulante de colônia de granulócitos humano (hG-CSF). A proteína hG-CSF tem importante papel no sistema imunológico baseado em neutrófilos defesas, devido às suas funções regulatórias no crescimento, diferenciação, sobrevivência e ativação de neutrófilos e seus precursores (Barreda *et al.*, 2004). Após sua produção como uma proteína humana recombinante (Souza *et al.*, 1986), o hG-CSF tem sido o fator de crescimento hematopoiético mais amplamente utilizado devido à sua eficácia no tratamento de formas de neutropenia e leucopenia induzida por quimioterapia, bem como para a mobilização de células progenitoras para o transplante autólogo ou halogênico (Welte *et al.*, 1996). O grupo da UECE utilizou a técnica de microinjeção pronuclear (Moura *et al.*, 2010) e obteve um casal de caprinos transgênicos da raça Canindé (Fig. 1). A ideia era valorizar a raça nativa, com risco de extinção, dando um valor agregado, ou seja, utilizando-a como biorreator de interesse em medicina humana (Freitas *et al.*, 2012). Nesses animais também foi estudado a dinâmica da proteína recombinante secretada no leite e verificou-se que a fêmea fundadora secretou 93,9 a 1.474,6 µg de hG-CSF por mililitro de leite. Dois picos de hG-CSF sérico (3.470 e 7.390 pg/ml) foram detectados na primeira metade da lactação. Por outro lado, fora da lactação, o hG-CSF estava ausente no soro, indicando que não houve expressão ectópica (Moura *et al.*, 2013). Ainda para estes animais transgênicos, estudou-se o número de cópias (NC) do transgene e verificou-se uma média (\pm DP) de NC de $9,0 \pm 0,0$ para fêmea e $6 \pm 0,5$ para o macho transgênico (Batista *et al.*, 2014a). Finalmente, todos os parâmetros clínicos, bem como a função renal e hepática, indicaram que os caprinos transgênicos (F0 e F1) apresentavam-se saudáveis e a proteína recombinante mostrou quantidades compatíveis com o uso desses biorreatores em um programa de produção da proteína em escala comercial (Batista *et al.*, 2014b).

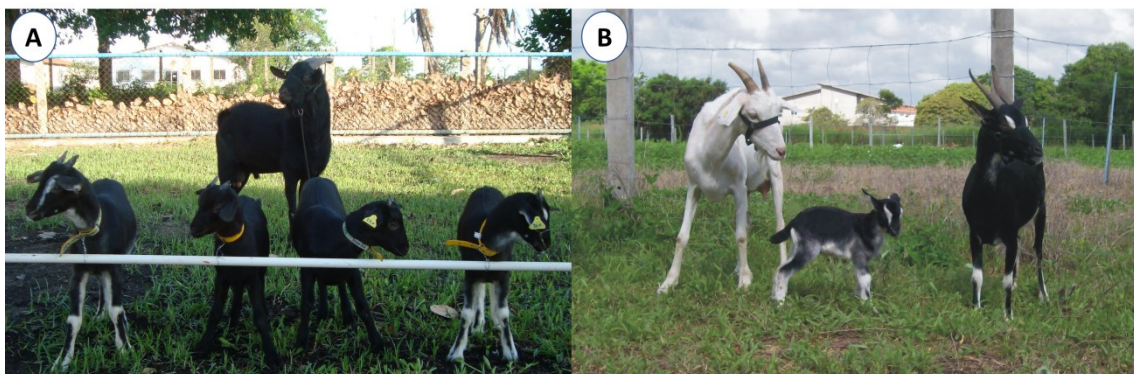


Figura 1. Caprinos transgênicos para o hG-CSF obtidos pelo grupo de pesquisa da Universidade Estadual do Ceará. A: Macho F0 da raça Canindé e suas crias transgênicas F1 (2 machos e 2 fêmeas) obtidas por inseminação artificial. B: Fêmea F0 da raça Canindé e sua cria transgênica F1 (1 fêmea) obtida por transferência de embriões para uma cabra sem raça definida (esquerda).

Também utilizando a técnica de microinjeção pronuclear, pesquisadores da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) obtiveram o nascimento de caprinos transgênicos secretando lisozima humana no leite. Posteriormente, pelo uso na alimentação de suínos, foi verificado que o leite transgênico apresentou atividade bactericida contra *Micrococcus luteus* e discreta sensibilidade contra *Enterococcus faecalis* em

relação aos controles. Na presença de patógenos, o leite transgênico promoveu melhores parâmetros de migração. Assim, a lisozima recombinante produzida no leite de cabras apresentou potencial para ser utilizado em fórmulas nutracêuticas, com os valores nutricionais e medicamentosos comparáveis aos do leite humano (Carneiro et al., 2018). Na mesma instituição, foi produzida uma cabra transgênica pela técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS). O animal foi geneticamente modificado para secretar leite contendo a enzima humana glucocerebrosidase. Em humanos, a ausência desta enzima desenvolve a doença de Gaucher, que pode causar aumento do fígado e baço, entre outras manifestações clínicas. O tratamento da enfermidade é caro, já que a enzima precisa ser importada para atender aos pouco mais de 600 portadores da doença no Brasil (Bertolini, comunicação pessoal, 2014).

Atualmente, a edição de genoma baseada no sistema formado por repetições palindrômicas curtas, interespaçadas e regularmente agrupadas (do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) está mostrando um grande potencial para gerar descendentes geneticamente modificados. Pequenos ruminantes têm mostrado grande potencial como modelos animais para a engenharia do genoma, o qual já foi manipulado utilizando sistemas baseados em CRISPR para diversos fins (Kalds et al., 2020). Assim, várias formas de modificações podem ser induzidas, permitindo a manipulação precisa do genoma de ovinos e caprinos para a geração de fundadores com características desejadas para aplicações em pesquisa básica, pecuária e biomedicina (Fig. 2). Diversos trabalhos já foram publicados descrevendo a obtenção de caprinos ou ovinos geneticamente modificados pelo uso da técnica de CRISPR/Cas9. No tocante à espécie ovinas podem ser citados: crescimento muscular (Crispo et al., 2015), comprimento da fibra (Le et al., 2017) e prolificidade (Zhou et al., 2018). Já na espécie caprina, os exemplos são: melhoria na qualidade e quantidade do cashmere (Huang et al., 2019) e prolificidade (Niu et al., 2018).

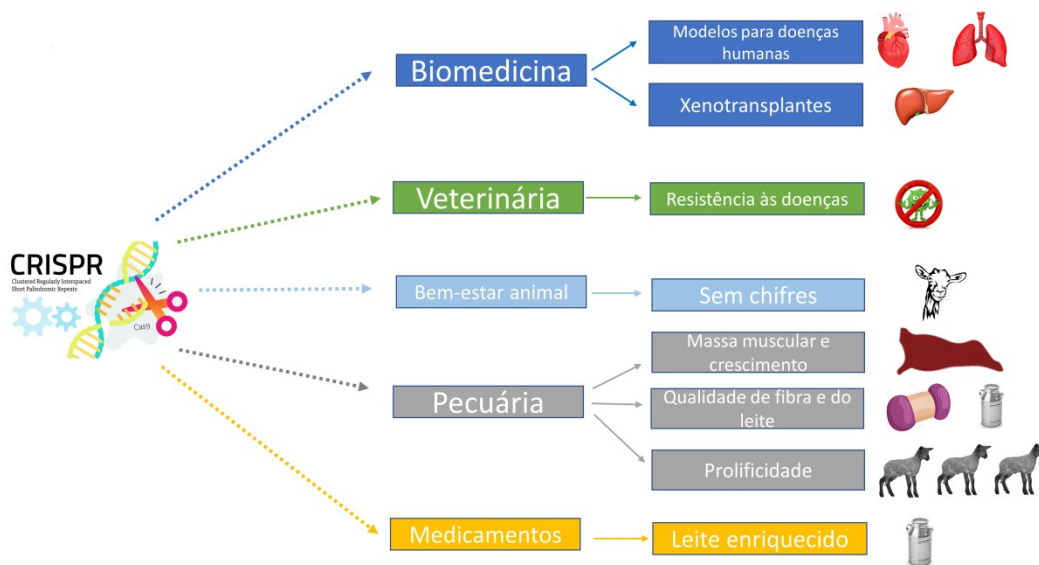


Figura 2. Algumas das aplicações práticas do sistema de edição de genoma baseado na técnica de CRISPR em caprinos e ovinos.

Clonagem

A clonagem animal representa um dos mais importantes avanços obtidos no campo da biotecnologia animal. Os resultados de clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) têm encorajado os pesquisadores para elucidação de diversos aspectos relacionados a essa técnica. Um dos mais importantes usos da TNCS é para clonagem reprodutiva, na qual um embrião reconstituído derivado da fusão de um oócito enucleado com uma célula somática pode chegar a termo que resulta em um animal clonado semelhante ao doador de núcleo. Essa técnica envolve várias etapas-chave, ou seja, (a) obtenção de oócitos maturados, (b) remoção dos cromossomos contidos nos oócitos (enucleação), (c) transferência de núcleo obtido do animal a ser clonado nos oócitos enucleados, (d) ativação dos oócitos reconstruídos, (e) cultivo *in vitro* dos embriões (f) transferência dos embriões para receptoras (Niemann e



Lucas-Hahn, 2012). Foi justamente um ovino, o primeiro mamífero clonado com o uso desta técnica (Wilmut *et al.*, 1997). Caprinos e ovinos transgênicos já foram produzidos pelo uso de técnicas de clonagem, tanto a TNCS (Baguisi *et al.*, 1999) como sua variante, o handmade cloning (Zangh *et al.*, 2013). Neste último estudo, a técnica de handmade cloning, já bem estabelecida em bovinos e suínos, foi utilizada para produzir ovelhas transgênicas com níveis elevados de ácidos graxos ômega-3.

Em pequenos ruminantes, uma boa parte das publicações utilizando a clonagem tiveram como objetivo principal a obtenção de animais transgênicos (Feng *et al.*, 2015). No entanto, clones também podem ser produzidos no intuito de multiplicar indivíduos geneticamente superiores (Bhat *et al.*, 2019). No Brasil, Traldi *et al.* (2007) relataram a gestação de uma ovelha receptora de dois embriões clones, a qual durou até 50º dia por acompanhamento ultrassonográfico. Por outro lado, um clone ovino da raça Santa Inês foi obtido no Ceará (Rodrigues, comunicação pessoal, 2015).

Sem dúvida, a importância da técnica de clonagem resulta também de seu potencial para a multiplicação de animais transgênicos. Dessa forma, nosso grupo utilizou a técnica de handmade cloning na tentativa de clonar a fêmea caprina transgênica para o hG-CSF. Usando ovários de abatedouro, um total de 18,0% (27/150) e 12,7% (19/150) dos embriões cultivados *in vitro* por sete dias alcançaram os estágios de mórula e blastocisto, respectivamente. Após transferência para receptoras, nenhuma deles apresentou prenhez, após acompanhamento por ultrassonografia (Pereira *et al.*, 2013).

Conclusões

Os últimos 30 anos do uso da transgênese e clonagem em pequenos ruminantes propiciaram avanços relevantes do ponto de vista tanto aplicado como de pesquisa. Atualmente, caprinos e ovinos portadores de modificações genéticas podem ser obtidos com relativa facilidade usando o sistema CRISPR. A associação desta técnica com a clonagem também aumenta a possibilidade de incrementar o número de animais geneticamente modificados. No entanto, a situação atual no país está completamente desfavorável a este tipo de pesquisa e esta condição está nos retirando do grupo de países participantes deste progresso científico.

Referências

- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe 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, Overström EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999
- Barreda D, Hanington P, Belosevic M.** Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol*, v.28, p.509-554, 2004.
- Batista RI, Luciano MC, Teixeira DI, Freitas VJ, Melo LM, Andreeva LE, Serova IA, Serov OL.** Methodological strategies for transgene copy number quantification in goats (*Capra hircus*) using real-time PCR. *Biotechnol Prog*, v.30, p.1390-1400, 2014a.
- Batista RI, Melo CH, Souza-Fabjan JM, Teixeira DI, Melo LM, Freitas VJ.** Phenotypic features of first-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulation factor production in milk. *Biotechnol Lett*, v.36, p.2155-2162, 2014b.
- Bhat MH, Yaqoob SH, Khan FA, Khan HM, Ganai NA, Shah RA.** Live birth of a Pashmina goat kid after transfer of handmade cloned embryos. *J Reprod Dev*, v.18, p.126, 2019.
- Bickhart DM, McClure JC, Schnabel RD, Rosen BD, Medrano JF, Smith TPL.** Symposium review: Advances in sequencing technology herald a new frontier in cattle genomics and genome-enabled selection. *J Dairy Sci*, v.103, p.5278-5290, 2020.
- Carneiro IS, Menezes JNR, Maia JA, Miranda AM, Oliveira VBS, Murray JD, Maga EA, Bertolini M, Bertolini LR.** Milk from transgenic goat expressing human lysozyme for recovery and treatment of gastrointestinal pathogens. *Eur J Pharm Sci*, v.112, p.79-86, 2018.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen, TH, Crenequy A, Brusseele L, Anegon I, Menchaca A.** Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PloS One*, v.10, e0136690, 2015.
- Ebert KM, Selgrath JP, Ditullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K.** Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, v.9, p.835-838, 1997.



- Feng X, Cao S, Wang H, Meng C, Li J, Jiang J, Qian Y, Su L, He Q, Zhang Q. Production of transgenic dairy goat expressing human alpha-lactalbumin by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res*, v.24, p.73-85, 2105.
- Freitas VJF, Serova IA, Moura RR, Andreeva LE, Melo LM, Teixeira DIA, Pereira AF, Lopes-Jr ES, Dias LPB, Nunes-Pinheiro DCS, Sousa FC, Alcântara-Neto AS, Albuquerque ES, Melo CHS, Rodrigues VHV, Batista RITP, Dvoryanchikov GA, Serov OL. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Res*, v.105, p.105-113, 2012.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, 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.
- Huang Y, Ding Y, Liu Y, Zhou S, Ding Q, Yan H, Ma B, Zhao X, Wang X, Chen Y. Optimisation of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9: single-guide RNA (sgRNA) delivery system in a goat model. *Reprod Fertil Dev*, v.31, p.1533e7, 2019.
- Kalds P, Gao Y, Zhou S, Cai B, Huang X, Wang X, Chen Y. Redesigning small ruminant genomes with CRISPR toolkit: Overview and perspectives. *Theriogenology*, v.147, p.25-33, 2020.
- Kues WA, Niemann H. Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med*, v.102, p.146-156, 2011.
- Li W, Liu C, Zhang X, Chen L, Peng X, He S, , Lin J-P, Han B, Wang L-Q, Huang J-C, Liu M-J. CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep. *FEBS J*, v.284, 2764e73, 2017.
- Moura RR, Lopes-Junior ES, Teixeira DI, Serova IA, Andreeva LE, Melo LM, Freitas VJ. Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats for DNA microinjection. *Reprod Domest Anim*, v.45, e101-106, 2010.
- Moura RR, Albuquerque ES, Melo CH, Alcântara-Neto AS, Batista RI, Nunes-Pinheiro DC, Pereira AF, Teixeira DI, Melo LM, Serova IA, Andreeva LE, Serov OL, Freitas VJ. 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.
- Niemann H, Lucas-Hahn A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.2-10, 2012.
- Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.762-770, 2007.
- Niu Y, Zhao X, Zhou J, Li Y, Huang Y, Cai B, Liu L, Ding Q, Zhou S, Zhao J, Zhou G, Ma B, Huang X, Wang X, Chen Y. Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9. *Reprod Fertil Dev*, v.30, p.307e12, 2018.
- Piedrahita JA, Mir B. Cloning and transgenesis in mammals: implications for xenotransplantation. *Am J Transplant*, v.6, p.43-50, 2004.
- Pereira AF, Feltrin C, Almeida KC, Carneiro IS, Avelar SRG, Alcântara Neto AS, Sousa FC, Melo CSH, 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 Ruminant Res*, v.109, p.163-172, 2013.
- Souza LM, Boone TC, Gabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, Barendt J, Platzer E, Moore MSA, Mertelsmann R, Welte K. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, v.232, p.61-65, 1986.
- Souza-Fabjan JMG, Batista RITPB, Correia LFL, Paramio MT, Fonseca JF, Freitas VJF, Mermillod P. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. *Reprod Fertil Dev*, v.33, p.31-54, 2021.
- Traldi AS, Miranda MS, Taroucou AK, Ricciardi M, Freitas IS, Catto DR, Silva ROC, Meirelles FV. Gestação de clones ovinos obtidos por transferência nuclear de célula somática em oócitos homólogos e heterólogos. *Acta Sci Vet*, v.35, p.1234, 2007.
- Welte K, Gabilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, v.88, p.1907-1929, 1996.
- Wilmot 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.
- Zhang P, Liu P, Dou H, Chen L, Chen L, Lin L, Tan P, Vajta G, Gao J, Du Y, Ma RZ. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 Fatty acids. *PLoS One*, v.8, e55941, 2013.
- Zhou S, Yu H, Zhao X, Cai B, Ding Q, Huang Y. Generation of gene-edited sheep with a defined Booroola fecundity gene (FecBB) mutation in bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR1B) via clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9. *Reprod Fertil Dev*, v.30, p.1616e21, 2018.