

PARÂMETROS CLÍNICOS E SOBREVIVÊNCIA DE POTROS CLONADOS A PARTIR DE CÉLULAS MESENQUIMAIS E FIBROBLÁSTICAS

BIANCA DE FÁTIMA DALLO¹; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA²; FLÁVIA MOREIRA³; MARÍA FERNANDA ORTIZ DE ELGUEA⁴; BRUNA DA ROSA CURCIO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – biancadallo@ufpr.br

²Universidade Federal de Pelotas – cewnogueira@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – flaviamoreira1357@gmail.com

⁴Hospital Equino Kawell, Solís, Provincia de Buenos Aires, Argentina

⁵Universidade Federal de Pelotas – curcio.brana@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A clonagem em equinos é uma técnica de reprodução avançada que visa a criação de cópias geneticamente idênticas de um animal a partir de células somáticas. Durante esse processo, os núcleos dessas células são transferidos para um óvulo enucleado. As células resultantes são estimuladas a se dividir e formar um embrião, este é implantado em uma égua receptora (CAMPBELL et al., 1996).

Os dois principais tipos de células utilizados nesse processo são os fibroblastos oriundos do tecido conjuntivo e as células-tronco mesenquimais. Os fibroblastos são frequentemente utilizados devido à sua facilidade de obtenção por biópsia cutânea, enquanto as células-tronco mesenquimais, de tecidos como a medula óssea são preferidas pela sua plasticidade e potencial regenerativo (OLIVEIRA et al., 2018).

Além da relevância científica do estudo da reprogramação nuclear e do desenvolvimento embrionário do cavalo por esta técnica, o interesse na clonagem aumentou para manter e reproduzir a composição genética de alta qualidade de animais esportivos. Por esta razão, desde que o primeiro cavalo clonado nasceu (GALLI et al., 2003), pesquisadores têm buscado aprimorar a metodologia para aumentar as taxas de descendentes saudáveis (OLIVEIRA et al., 2018).

Potros clonados de programas de clonagem nos EUA, Argentina e na Colômbia mais recentemente, apresentaram uma série de patologias desde a gestação até período neonatal, como mortalidade embrionária precoce, abortos, natimortos e nascimento de potros fracos (JOHNSON et al., 2010; JOHNSON & HINRICHS, 2015). Entretanto, essas alterações ocorreram em menor frequência em gestações de potros clonados de células da medula óssea quando comparados aos obtidos a partir de células de fibroblastos (OLIVERA et al., 2018).

Esses últimos autores argumentam que a eficiência da transferência nuclear se deve à capacidade da célula doadora de estar em um estágio totipotente comandado pelo receptor do oócito, que justificaria melhores índices das células mesenquimais. Dessa forma, o objetivo deste estudo é comparar o potencial de desenvolvimento de potros derivados de células mesenquimais (MSQ) com potros derivados de fibroblastos (FB), com foco na avaliação clínica patológica para determinar o efeito da célula doadora nuclear nos clones.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados no total, dados de 298 potros clones oriundos de Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT), sendo 109 potros clones oriundos de fibroblastos (FB) e 189 oriundos de células mesenquimais da medula

óssea (MSQ), advindos de centros de clonagem da Argentina, nascidos nas temporadas de 2014 a 2022. As gestações foram diagnosticadas por ultrassonografia transretal 7–15 dias após a transferência do embrião clone. Entre 20 e 30 dias antes do parto previsto, as éguas prenhes foram transportadas para um hospital de equinos (KAWELL, Equine Rehabilitation Center, Solís, Argentina) para parir. Durante a fase final da gestação, a frequência cardíaca e a atividade fetal, a qualidade da placenta e anormalidades umbilicais foram monitoradas por ultrassonografia transabdominal, todos os dias e em casos necessários, duas vezes ao dia, já a ultrassonografia transretal, era realizada a cada 15 dias ou se necessário, toda semana.

Quando as éguas apresentavam sinais iminentes de parto, as mesmas eram conduzidas para baia maternidade para o monitoramento do parto. Após a expulsão do neonato, esperava-se a eliminação das membranas fetais naturalmente, as quais foram coletadas e avaliadas quanto ao peso e a presença de anormalidades. Amostras sanguíneas foram coletadas por punção jugular do neonato clone, em tubos sem anticoagulante, após decantação, as amostras foram centrifugadas, e o soro obtido, armazenados em eppendorfs em freezer -20° até as dosagens. As coletas foram realizadas nas primeiras 3 horas após o nascimento. Os níveis plasmáticos de creatinina foram aferidos pelo método de espectrofotometria (Byosystem bts 300®). Foram comparados os dados de tempo de gestação em dias, sobrevivência ou não ao nascer até 15 dias após nascimento, peso ao nascer (kg), peso da placenta (kg), relação entre o peso do potro e peso da placenta, e a concentração de creatinina (mg/dL) dos potros provenientes de clonagem a partir de fibroblastos e células mesenquimais.

A comparação entre grupos foi realizada por Qui-quadrado para variáveis categóricas e Test T para variáveis quantitativas. As diferenças nos valores médios foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. Potros clones gerados a partir de fibroblastos (FB) apresentaram maior peso ao nascer em relação aos potros clones oriundos de células mesenquimais (MSQ) ($p < 0,05$), os valores estão descritos na Tabela 1. Considerando que os cavalos da raça AI Polo Argentino nascem com 45–55 kg em média (de acordo com informações obtidas do hospital equino argentino Kawell), ambos os grupos de clonagem estavam na faixa de normalidade.

Tabela 1 - Parâmetros clínicos e taxa de mortalidade em potros a termo, clonados a partir de células mesenquimais e fibroblastos

Parâmetros	Células mesenquimais n= 189	Fibroblastos n= 109
Peso placenta (kg)	4,75 \pm 1,1 ^a	5,64 \pm 2,1 ^b
Peso potro (kg)	43,5 \pm 6,2 ^a	45,3 \pm 6,9 ^b
Peso potro/ peso placenta	9,5 \pm 2,2 ^a	9,1 \pm 4,4 ^a
Tempo de gestação (dias)	347,7 \pm 13,1 ^a	348,2 \pm 15,2 ^a
Creatinina (mg/dL)	2,37 \pm 1,2 ^a	2,54 \pm 1,6 ^a
Mortalidade (%)	5,8 ^a	16,7 ^b

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística no Teste T e Qui- quadrado (mortalidade).

A taxa de mortalidade ao nascer também foi maior para o grupo FB (16,7%, n=18/109) do que no grupo MSQ (5,8%, n=11/189). Resultados semelhantes foram

vistos por OLIVERA et al., (2017) e OLIVERA et al., (2018), com clones da raça Polo Argentino em até 3 semanas de vida. Recentemente, um estudo semelhante conduzido na Colômbia, buscou, além de outras análises, verificar o risco de morte em clones em cada linhagem celular. A análise revelou que o grupo de origem fibroblástica apresentou maior risco de morte, com uma razão de chances (OR) de 9.1 ($p < 0,01$) em relação aos potros clonados de células da medula óssea e não clonados. Além disso, observou probabilidade significativamente maior de mortalidade (OR 4.4, IC 1.03-17) (AYALA & ESPINOSA, 2024). Considerando que as células fibroblásticas sejam menos eficazes na reprogramação nuclear e adaptação ao ambiente embrionário do que as células mesenquimais, resultando nos índices inferiores na viabilidade da prole.

Placentas provenientes do grupo FB apresentaram maior peso que placentas do grupo MSQ (Tabela 1). Apesar disso, a placenta de clones FB não ultrapassou a relação de 10-11% no índice peso da placenta/peso do potro ao nascer, considerado fisiológico. No presente estudo não foram colhidos dados das características macroscópicas das placentas, entretanto, essas alterações são frequentemente relatadas em programas de clonagem de diferentes espécies, como edema placentário, aumento de espessura da junção uteroplacentária, cordão umbilical espesso associado a vasos umbilicais dilatados e edema umbilical, dilatação do útero, foram relatados anteriormente em gestações equinas resultantes de clonagem. Mais uma vez, essas alterações parecem estar associadas à reprogramação genética anômala da célula receptora, resultando em modificação epigenética inadequada no desenvolvimento placentário (PALMIERI et al., 2008). Dessa forma mais estudos são necessários para avaliar a morfologia placentária a nível histológico e ultra estrutural e assim, corroborar com a técnica.

Neste estudo o tempo de gestação dos potros provenientes de células e MSQ não apresentou diferença (Tabela 1), e estava dentro do intervalo fisiológico nesta raça, que pode variar entre 310 e 365 dias (OLIVEIRA et al., 2018). Por fim, os níveis de creatinina não diferiram entre grupos (Tabela 1) e nem extrapolaram os valores esperados para neonatos equinos (1,1–2,0 mg/dL). Valores aumentados de creatinina em neonatos sugerem disfunção placentária, uma vez que ela atua como órgão excretor fetal (MORRESEY, 2005; OLIVEIRA et al., 2018).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que potros clonados a partir de células-tronco mesenquimais tiveram menor taxa de mortalidade e menores pesos de placenta e potros, em comparação com aqueles clonados a partir de fibroblastos, sugerindo que a clonagem com células mesenquimais pode ser uma alternativa mais segura e viável para a produção de potros saudáveis.

Agradecimentos: A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYALA, M.S.F.; ESPINOSA O.O. Disease characterization in cloned foals in Colombia, the effect of placental pathologies on the success and survival of cloned foals from two different cell lines. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, São Paulo, v. 61, p. 1-13, 2024.

<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2024.211804>

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 64-66, 1996.

GALLI, C.; LAGUTINA. I.; CROTTI. G.; et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v. 424, n.6949, p.635, 2003.

JOHNSON, A.K.; HINRICHS, K. Neonatal care and management of foals derived by somatic cell nuclear transfer. **Methods Molecular Biology**, 1330:189-201, 2015. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2848-4_16.

JOHNSON, A.K.; CLARK-PRICE, S.C.; CHOI, Y-H.; HARTMAN, D.L.; HINRICHS, K. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004-2008). **Journal of the America Veterinary Medical Association**, v. 236, n.9, p.983-990, 2010. <http://doi.org/10.2460/javma.236.9.983>

MORRESEY, P.R. Prenatal and perinatal indicators of neonatal viability. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, p. 238-249, 2005. doi: 10.1053/j.ctep.2005.07.005

OLIVERA, R.; MORO, L.N.; JORDAN, R.; LUZZANI, C.; MIRIUKA, S.G.; VICHERA G. 37 healthy foals produced using bone marrow-mesenchymal stem cells as nuclear donors in horse cloning. **Reproduction, Fertility and Development**, v.30, n.1, p. 158-158, 2017. <https://doi.org/10.1071/RDv30n1Ab37>

OLIVERA, R.; MORO, L.N.; JORDAN. R.; PALLAROLS, N.; GUGLIELMINETTI, A.; LUZZANI, C.; MIRIUKA, S.G.; VICHERA. G.; Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. **Stem Cells Cloning**, v. 11, p.13-22, 2018. <http://doi.org/10.2147/SCCAA.S151763>

PALMIERI, C; LOI, P; PTAK, G; DELLA SALDA, L. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. **Veterinary Pathology**, v.45, n.6, p.865-880, 2008. <http://doi.org/10.1354/vp.45-6-865>.