



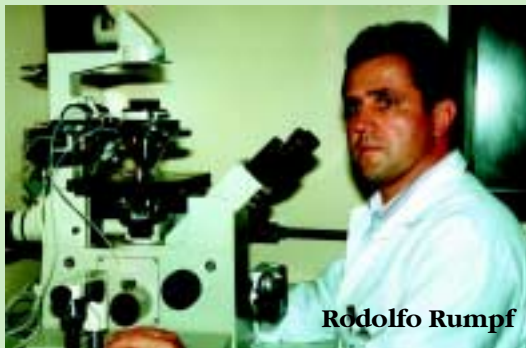
A CLONAGEM DE BOVINOS NO BRASIL

*Entrevista concedida a
Lucas Tadeu Ferreira*

E-mail do Dr. Rodolfo Rumpf:
rodolfo@cenargen.embrapa.br

Fotos: Cláudio Bezerra

Os segredos da Vitória



Rodolfo Rumpf

A EMBRAPA surpreende o mundo e anuncia que obteve o primeiro nascimento de um clone bovino, da raça simental, na sua fazenda experimental de Brasília, no mês de março de 2001.

Apelidada simpaticamente de Vitória, pelo seu próprio criador e líder do projeto de pesquisa de clonagem, o médico veterinário Ph.D, Rodolfo Rumpf, que explica que para a obtenção da Vitória foram utilizados óvulos imaturos de vacas mestiças das raças nelore e simental e que

foram feitas vinte e nove tentativas e só uma deu certo, culminando com o nascimento da Vitória, que teve a gestação e parto normais.

De acordo com Rodolfo Rumpf, a técnica de clonagem da Vitória foi muito parecida com a empregada na produção da ovelha Dolly, em 1997, na Escócia. A diferença básica dos métodos empregados na obtenção dos dois animais é a origem da célula doadora do núcleo, onde fica o material genético extraído e transferido. As que deram origem à ovelha Dolly foram obtidas de glândulas mamárias de uma fêmea de sete anos, enquanto que as células do núcleo que originaram a Vitória foram extraídas de um embrião de apenas cinco dias e transferidas para outro embrião da mesma idade e raça.

Vitória nasceu perfeita, o que deixou Rodolfo e sua equipe muito confiantes quanto à continuidade do projeto de clonagem na Embrapa. Os objetivos pretendidos pela Embrapa com este projeto de clonagem, no médio e longo prazos, são principalmente a regeneração de bancos genéticos, a multiplicação de animais com boas características genéticas, a otimização e maximização do potencial genético das raças de interesse zootécnico, além de possibilitar o resgate e a multiplicação de raças silvestres ou comerciais em risco de extinção, incluindo aí o melhoramento genético de todas elas.

Para falar um pouco mais deste projeto de pesquisa que resultou na Vitória e do estado da arte da clonagem animal, no Brasil, Rodolfo Rumpf, que é pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, concedeu esta entrevista a Lucas Tadeu Ferreira para esta edição da revista BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento.

BC&D - Qual foi a técnica empregada na obtenção da bezerra Vitória?

Rodolfo Rumpf - A técnica empregada na obtenção da Vitória é conhecida como transferência nuclear. Utilizamos uma célula doadora de núcleo oriunda de um embrião que, efetivamente, transferiu a herança genética para um ovócito receptor previamente nucleado, de uma outra vaca. Trabalhamos com o núcleo de um material genético elite e o citoplasma que recebeu este núcleo de um outro animal que não era de elevado mérito genético. Um ponto importante temos que esclarecer: neste citoplasma havia também o DNA mitocondrial o qual pode ser responsável por características fenotípicas, inclusive de produção. Com a Vitória, temos um clone, mas não é um clone verdadeiro, como se diz. Ele tem algumas características de DNA externo àquele de seu núcleo oriundo da célula do embrião doador.

BC&D - Neste caso, a Vitória é clone de qual animal e pertence à que raça?

Rodolfo Rumpf – Vitória é clone de um embrião que não chegou a nascer, que era oriundo de um acasalamento da raça simental. Isto foi muito questionado quando anunciamos o nascimento dela: “se ela não é igual a outro animal, não é clone”. Na verdade, foi a própria mídia que divulgou que a tecnologia de transferência nuclear é igual à clonagem. Mas, não é exatamente assim. A melhor técnica de que dispomos hoje para viabilizar a clonagem - cópia de indivíduos idênticos em larga escala - é de fato a transferência nuclear. Por exemplo: se daquele embrião que nós utilizamos na transferência nuclear e obtivemos a Vitória conseguíssemos ainda produzir outros três embriões que, infelizmente, não prosperaram, tivéssemos obtido mais de um nascimento, esses indivíduos seriam idênticos - seriam clones. Este é um ponto importante que cabe esclarecer porque ficou a dúvida na mídia. De fato, a técnica da transferência nuclear permite obter clones, com a ressalva das questões relativas à herança citoplasmática já discutidas.



Cabe ainda uma explicação adicional a esta pergunta: O clone verdadeiro só seria obtido a partir da separação das células de um embrião muito jovem - 3 a 4 dias - , as quais ainda possuem a capacidade de se desenvolver isoladamente e cada uma podendo dar origem a um novo embrião. Neste caso, o número de possibilidades iniciais não passaria de 8 cópias se tudo fosse 100% para a espécie bovina. A outra alternativa seria a clonagem de

“A técnica empregada na obtenção da Vitória é conhecida como transferência nuclear. Trabalhamos com o núcleo de um material genético elite e o citoplasma que recebeu este núcleo de um outro animal que não era de elevado mérito genético”

uma vaca adulta em que tanto a célula doadora do núcleo como o ovócito receptor fossem obtidos dela mesma. No novo indivíduo tanto o DNA mitocondrial como o nuclear possuem a mesma origem. O macho sempre vai depender de um citoplasma de alguma fêmea e por isso não seria verdadeiro.

BC&D - Em que ano foram iniciados os primeiros trabalhos desta pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, quem financiou, quanto custou, e quais foram os seus principais parceiros?

Rodolfo Rumpf - Em 1989, quando cheguei à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o Dr. Assis Roberto De Bem, que faleceu precocemente,

já conduzia a parte inicial das pesquisas na área animal juntamente com o Dr. Teodore Romano Vaske. Escrevemos um programa de pesquisa de reprodução animal, que existe até hoje, onde prevíamos por etapas o que iríamos fazer na área da biotecnologia da reprodução e com a conservação de recursos genéticos animais. Sempre trabalhamos para criar e preservar sêmen, óvulos, embrião ou células, quer dizer, o banco genético de animais, mas também visando regenerar este banco genético, trazer de volta o germoplasma e disponibilizá-lo nos rebanhos. Todas as nossas tecnologias foram dirigidas para este objetivo. Em 1993, fiz um treinamento de pós-doutorado no Canadá, na Universidade de Montreal, no Centro de Pesquisa em Reprodução Animal sob a orientação do Dr. Lawrence Smith, que é um brasileiro naturalizado canadense e trabalhou em sua tese de doutorado com o Dr. Ian Wilmut - quem produziu a ovelha Dolly, na Escócia. Neste ano, ao retornar para Brasília, iniciamos a aquisição de equipamentos, construção de laboratórios, formação de recursos humanos, e tínhamos também que melhorar os índices técnicos da fecundação *in vitro* num patamar técnico-científico que justificasse a clonagem. Efetivamente, em 1999/2000 é que, de fato, a clonagem ganhou espaço no nosso laboratório, porque as outras tecnologias já haviam atingido a maturação científica necessária para dar suporte a ela. Gastamos, nos últimos três anos, perto de 300 mil reais em custeio, porque já tínhamos a infra-estrutura. Quem financiou as pesquisas foi a Embrapa, além da Fundação de Apoio à Pesquisa – FAP-DF que aprovou um projeto de produção de embriões e clones *in vitro* e nos ajudou a impulsionar este trabalho. Como ‘parceiros’, tivemos basicamente a minha formação no Canadá e, depois, não tivemos muita interação com o pessoal de lá. No Brasil, contribuímos para estruturar o laboratório de transferência nuclear da USP já que eu co-orientava um estudante de mestrado do professor Visintin; as parcerias efetivamente vão se constituir daqui pra frente. Espero. A equipe específica envolvida com os experimentos de transferência nuclear

foi constituída por mim, dois estudantes de mestrado e o técnico Regivaldo Vieira de Sousa, da Embrapa. Uma andorinha só não faz verão; é necessário o apoio das outras biotécnicas para viabilizar com eficiência a clonagem, e aí a equipe é bem maior.

BC&D - Qual a principal diferença da técnica empregada na obtenção da bezerra Vitória e da ovelha Dolly?

Rodolfo Rumpf – Basicamente, a técnica de transferência nuclear é a mesma. Existem peculiaridades com relação ao momento da nucleação do citoplasma, mas a grande diferença é que a Dolly vai ter este mérito pelo resto da história, já que foi concebida de uma célula de um indivíduo adulto, extraída da glândula mamária, ou seja, de uma célula somática diferenciada. Essa sinalização de Dolly nos abriu muitos outros caminhos e a nossa Vitória seria um passo anterior à Dolly, porque trabalhamos com uma célula embrionária que antecede a sua diferenciação. Vitória foi obtida de uma célula que, do ponto de vista da reprogramação nuclear, provavelmente é muito mais ‘reprogramável’ do que uma célula somática.

BC&D - Quantas tentativas de clonagem foram realizadas para obtenção da Vitória?

Rodolfo Rumpf - Foi na terceira gestação que obtivemos êxito. As outras perdemos por excesso de zelo. Neste experimento estávamos olhando muito mais para o citoplasma receptor do que para o núcleo. Utilizamos um embrião de cinco dias e meio congelado, que coletamos pela técnica de transferência de embriões clássica; ele foi descongelado e suas células separadas. No citoplasma estávamos avaliando outros aspectos relativos a qualidade. Por que o citoplasma é importante? Ele contém todas as mensagens que permitem a reprogramação do núcleo. Alguns anos atrás atribuíamos todo este mérito ao núcleo. Hoje sabemos que se não for um bom citoplasma e se ele não estiver devidamente sintonizado com o núcleo não vamos ter suces-



so. Este é o segredo. Produzimos neste experimento da Vitória mais de vinte embriões; quinze foram inovulados, ou seja, transferidos para mães de aluguel distintas e destes quinze resultou apenas a Vitória. A Vitória teve origem num embrião, o qual após o descongelamento conseguimos isolar vinte e nove células viáveis que resultaram em quatro embriões no estágio de blastocisto, que é o estágio esperado de um embrião de sete dias. Estes quatro embriões foram transferidos para diferentes receptoras e nasceu apenas a Vitória.

“Com a Vitória, temos um clone, mas não é um clone verdadeiro, como se diz. Ele tem algumas características de DNA externo àquele de seu núcleo oriundo da célula do embrião doador”

BC&D – É correto afirmar que a Dolly já nasceu “velha” – com idade do doador das células adultas -, e que a Vitória nasceu totalmente jovem, com a idade do embrião doador do núcleo?

Rodolfo Rumpf – Sim, isto é um fato. Mas é um conceito que está hoje um pouco ultrapassado, porque esta questão da idade está relacionada à atividade de uma enzima, a telomerase, que produz os telômeros, localizados nas extremidades dos cromossomos e que ajudam na hora da divisão celular, para que não ocorram translocações, erros na divisão celular. À medida que a

idade avança, a ação da telomerase vai diminuindo e o indivíduo vai ficando mais exposto a doenças de fundo genético. Depois desta constatação, de que a Dolly teria a idade biológica da doadora do núcleo, se provou em outros ensaios que é possível interferir na atividade da telomerase, e inclusive aumentar a expectativa de vida do futuro clone. Acredito que a questão da idade do clone de indivíduos adultos, logo, logo será resolvida, se é que já não

foi. A Vitória teria biologicamente a idade de uma concepção normal.

BC&D - Numa próxima etapa das pesquisas da Embrapa, o senhor pretende empregar técnicas semelhantes às da ovelha Dolly para obtenção de novos clones?

Rodolfo Rumpf – Sim, sem dúvida. Estamos iniciando agora pesquisas com células somáticas, fibroblastos da pele. Tiramos um pedacinho da orelha do animal e este pedaço de pele é capaz de produzir muitas células pelo cultivo em laboratório e se tornar uma fonte doadora de núcleos quase inesgotável. Esta técnica nos interessa mais pelo seu potencial em termos de regeneração de raças em vias de extinção, tanto domésticos como silvestres. Será possível no futuro regenerar animais silvestres atropelados, encontrados mortos nas rodovias. Vamos pegar um pedaço de pele de um indivíduo, mandar para um laboratório, fazer um banco de células e guardar para no futuro regenerar animais. O que tem que ficar bem claro é que partes desta tecnologia já foram patenteadas em outros países e que o uso é restrito para trabalhos científicos. A partir do momento em que formos trabalhar em escala comercial vamos nos inserir no contexto legal que protege a propriedade intelectual.

BC&D - Além do avanço científico, que vantagens comparativas a clonagem pode oferecer em relação à reprodução convencional?

Rodolfo Rumpf - Temos que deixar bem claro que a clonagem ainda não está suficientemente madura para ser utilizada na multiplicação de animais de interesse zootécnico. Temos uma

'picada' aberta. Falta ainda abrir a estrada, pavimentá-la etc., e chegar a uma relação custo/benefício compatível com a atividade. Existe um estudo dos melhoristas franceses que mostra que, por simulação, a partir do momento em que se usa estas modernas biotécnicas de multiplicação animal, aí incluída a fecundação *in vitro*, a punção folicular, a sexagem do sêmen, a própria clonagem, o congelamento etc., enfim, todas estas tecnologias devidamente articuladas, é possível conseguir em um ano o avanço genético para determinada característica que, normalmente, pelos métodos convencionais, demoraria doze anos.

BC&D - A clonagem pode contribuir com a produção de animais transgênicos?

Rodolfo Rumpf - Temos relacionado três grandes áreas de utilização da clonagem: a regeneração de recursos genéticos, a questão da produção animal, o apoio que ela dará aos programas de melhoramento genético animal, e o suporte científico para a própria embriologia e para a produção de animais transgênicos. Por que isso? De um pedaço de pele, por exemplo, conseguimos fazer talvez milhões de células. Transformamos estas células *in vitro*, fazemos uma transfecção, colocamos junto a um gene marcador, e depois de alguns dias identificamos as células que efetivamente foram transformadas geneticamente, e usamos estas células no sistema de reconstrução nuclear. Com isso, conseguimos melhorar em muito a eficiência na produção dos transgênicos. Portanto, tem tudo a ver a técnica da clonagem com os transgênicos, e esse é o próximo passo que vamos dar.

BC&D - Quais vantagens e benefícios podem ser incorporados aos animais transgênicos clonados?

Rodolfo Rumpf - O que pensamos em fazer em termos de transgênicos? No início, estamos preocupados em desenvolver um modelo porque temos de um lado um projeto de conservação e caracterização de recursos genéticos, e um segundo que faz prospecção de genes; além de um terceiro projeto que desenvolve ferramentas biotecnológicas, que é o nosso. Os esforços devem andar juntos e o dia em que for encontrado genes de interesse, a tecnologia de

obtenção de animais transgênicos deverá já estar dominada. Assim poderemos transferir genes associados a resistência a endo e ectoparasitas, por exemplo, de animais comerciais. Com isso estaríamos diminuindo o custo de pro-

“Na verdade, foi a própria mídia que divulgou que a tecnologia de transferência nuclear é igual à clonagem. Mas, não é exatamente assim. A melhor técnica de que dispomos hoje para viabilizar a clonagem - cópia de indivíduos idênticos em larga escala - é de fato a transferência nuclear”

dução, melhorando a qualidade da carne ou do leite, beneficiando tanto o produtor como, e, principalmente, o consumidor. Este é apenas um exemplo que ainda não sabemos se efetivamente será possível, mas existe muitas outras possibilidades de uso de animais transgênicos. A produção de biomoléculas, a melhoria na eficiência de produção, a qualidade de produtos e a produção de modelos animais para estudos de doenças ou até mesmo para a doação de

“Por que o citoplasma é importante? Ele contém todas mensagens que permitem a reprogramação do núcleo. Alguns anos atrás atribuíamos todo este mérito ao núcleo. Hoje sabemos que se não for um bom citoplasma e se ele não estiver devidamente sintonizado com o núcleo não vamos ter sucesso. Este é o segredo”

órgãos (os xenotransplantes), entre outras possibilidades de uso. Em última análise, agregar valor ao produto final. O que é bom para o consumidor deve ser bom para o produtor também.

BC&D - Qual é objetivamente a finalidade principal do seu trabalho?

Rodolfo Rumpf - É desenvolver ferramentas biotecnológicas que viabilizem

o banco genético e que permitam regenerar qualquer animal de interesse zootécnico e/ou em risco de extinção. Regenerar significa tirar a célula, o ovócito, o sêmen, o embrião que está lá no botijão congelado, fazer indivíduos a partir deste material, e trazer este material genético de volta para o rebanho. Esta é a motivação inicial de todo o trabalho. Estamos hoje no modelo bovino. Deveremos começar a trabalhar com ovino, caprino, enfim, o importante é que cada espécie tem suas individualidades fisiológicas e que a inserção da tecnologia no modelo específico só terá sucesso se for efetuado segundo a base fisiológica. É claro que estas tecnologias possuem uma enorme demanda do setor produtivo e, dentro do possível, procuramos atendê-lo.

BC&D - Na sua opinião, como a comunidade científica reagiu ao anúncio do clone Vitória?

Rodolfo Rumpf - Pelo que temos recebido de manifestação, a comunidade científica se mostrou muito satisfeita com a Vitória. É importante frisar que, hoje, conseguimos a Vitória e que vamos conseguir mais ainda no Brasil. Já existem aqui quatro ou cinco laboratórios trabalhando com transferência nuclear, e isso é muito bom porque imagino que vamos ter um grande progresso, desta técnica específica, em um futuro próximo. E, como eu disse, temos muito a fazer ainda; o que fizemos foi apenas abrir uma 'picada' na selva. Tem toda uma maturação da tecnologia ainda pela frente. Se tivermos várias equipes, com várias cabeças e em ecossistemas distintos, trabalhando com objetivos semelhantes, então vamos ter, seguramente, um grande progresso científico nessa área. Gostaria de mencionar que hoje temos equipe de pesquisadores na Unesp de Jaboticabal, na Faculdade de Medicina Veterinária da USP/SP, na Faculdade de Veterinária, da URGs, na Faculdade de Veterinária da Norte-Fluminense e também no estado do Pará. Todos, se ainda não estão trabalhando, estão montando seus laboratórios, e, seguramente, logo vamos ouvir falar dos feitos de todos eles.

BC&D - Podemos afirmar que, a partir da Vitória, o Brasil encontra-se hoje ao lado dos países do primeiro mundo no domínio da tecnologia da clonagem animal?

Rodolfo Rumpf - É difícil fazer esta afirmação. A grande diferença é a agilidade que se tem lá fora nos países desenvolvidos em relação ao que temos aqui, no Brasil. Agilidade desde a importação de um determinado reagente, à rapidez com que a ciência básica responde a demandas específicas. No Brasil temos que abrir espaço e fomentar cada vez mais a ciência básica; é ela que nos dá o suporte necessário às pesquisas aplicadas. Quando se busca o desenvolvimento tecnológico tem-se que parar muitas vezes, e voltar, fazer parcerias, buscar respostas que não se tem disponíveis naquele momento. Isto acontece em qualquer lugar do mundo, mas eu diria que lá fora eles têm mais agilidade exatamente porque investem mais em pesquisa básica.

BC&D - Do ponto de vista biológico e veterinário, quais as características deletérias potenciais que podem se expressar na Vitória a longo prazo?

Rodolfo Rumpf - Isto nós não sabemos. Estamos atualmente extremamente satisfeitos porque os nove meses de gravidez foram de aflição, e as duas últimas semanas, antes do nascimento, foram altamente estressantes para nós; porque tínhamos um plantão de 24 horas, não queríamos interferir de jeito algum, aguardamos mesmo o limite para o parto ocorrer naturalmente, e, para nossa surpresa, tudo ocorreu dentro da maior normalidade possível. Há que se dizer também que a mãe de aluguel é uma mãe de primeira. Ela não só pariu como fez todos os procedimentos necessários, como massagear, limpar a bezerra, também amamentou no período desejável e, por fim, eliminou a sua placenta. Nós acompanhamos à distância e registramos todas as informações possíveis. Contudo, até o momento, estamos muito contentes e felizes. Nada nos garante que daqui a alguns dias ela não tenha um problema imunológico qualquer e que venha a falecer como já aconteceu com outros clones nascidos no mundo. Vitória se tornou um pequeno laboratório de estudos e vai ser um indicador eterno para nós como a Dolly está sendo para o mundo.

BC&D - É possível a clonagem hu-

mana usando as mesmas técnicas?

Rodolfo Rumpf - Este é um terreno complicado e eu não me considero em condições de comentar muito sobre isto. Antes de comentar o assunto é importante voltarmos para a questão

“Estamos iniciando agora pesquisas com células somáticas, fibroblastos da pele. Tiramos um pedacinho da orelha do animal e este pedaço de pele é capaz de produzir muitas células pelo cultivo em laboratório e se tornar uma fonte doadora de núcleos quase inesgotável”

conceitual da clonagem e da transferência nuclear. A clonagem humana não tem nada que possa justificá-la, já a transferência nuclear poderia encontrar indicação pontual na clínica reprodutiva, ou ainda nas pesquisas de doenças hereditárias, por exemplo. Se existir uma indicação clínica pontual, não vejo razão no futuro para que ela

“A grande diferença é a agilidade que se tem lá fora nos países desenvolvidos em relação ao que temos aqui, no Brasil. Agilidade desde a importação de um determinado reagente, à rapidez com que a ciência básica responde a demandas específicas”

não venha a ser utilizada, mas muito antes de discutirmos isso, temos que ouvir o que a sociedade deseja. Somos favoráveis à criação de instrumentos legais e éticos que permitam o desenvolvimento da ciência e monitorem o “bom uso” das tecnologias.

BC&D – Quais os limites da legislação brasileira à clonagem humana?

Rodolfo Rumpf - De fato, a legislação brasileira deve ser revista neste aspecto e eu gostaria que tivéssemos uma legislação muito clara, que criasse mecanismos de regulamentação do uso da transferência nuclear e que não proibisse tudo simplesmente. Neste sentido, já existem os conselhos de ética, mas também deveria existir, a exemplo da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, um fórum em âmbito nacional, com todos os segmentos da sociedade lá representados e que pudesse opinar sobre questões éticas e científicas. Este fórum deveria exigir o cadastramento de todos os pesquisadores que trabalham com transferência nuclear, com bom curriculum acadêmico, condições de trabalho adequadas, descrição detalhada do que estão fazendo e para que estão fazendo, se não existe outro modelo científico que possa trazer as mesmas informações e se existe coerência entre a metodologia e os objetivos, entre outras informações importantes. Todos os projetos passariam obrigatoriamente por um crivo científico e ao mesmo tempo ficariam sujeitos a uma análise dos outros segmentos da sociedade que, em última instância, é que têm que nos dizer o que é que temos que fazer.

BC&D - Na sua opinião, a sociedade brasileira, de um modo geral, está preparada para receber os clones animais?

Rodolfo Rumpf – Até agora, temos tido um retorno muito bom das pessoas para as quais temos proferido palestras sobre a clonagem e as modernas biotécnicas de reprodução animal, em todo o país. A própria mídia tem assimilado de forma muito satisfatória esta questão. Basta ler a cobertura que os jornais, as revistas e a televisão deram ao anúncio da Vitória. É claro que sempre vai haver os mais diversos questionamentos dos segmentos representativos da sociedade, e é importante e bom que seja assim. Temos que aproximar, cada vez mais, os cientistas da sociedade e a sociedade dos cientistas. E a Vitória, de alguma forma, está contribuindo para esta aproximação. Em última análise trabalhamos para melhorar a qualidade de vida dos nossos cidadãos e quando explicamos de que forma isso irá acontecer, as coisas são muito bem assimiladas.