



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

# Animais Transgênicos utilizados como Biorreatores

Por  
Sharon Lisauskas Ferraz de Campos

Tese apresentada ao Departamento de  
Biologia Celular como requisito à obtenção do título  
de DOUTOR EM BIOLOGIA MOLECULAR.

Orientador: Prof. Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

Brasília,

Março de 2008

***Para sermos referência de outras pessoas,  
devemos saber a hora exata  
da ação e da omissão,  
e ainda assim seremos considerados Líderes.***

*Sharon Lisauskas*

**Ao meu filho Hugo Lisauskas Campos,  
minha vida.**

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre ao meu lado, iluminando todas as minhas atividades e decisões.

Aos meus pais José Carlos e Felícia, por todo sacrifício, apoio e amor que me deram, e por estarem sempre presentes em todas as horas decisivas da minha vida.

Ao meu eterno filho Hugo Lisauskas Campos, por fazer da minha vida, a sua.

À minha querida irmã Ana Carolina e sobrinha Vitória, de que amo tanto.

Ao meu querido afilhado Henry e ao meu divertido cunhado Océlio.

Ao meu marido Haroldo Campos, por todo apoio nas horas de desânimo e alegria, e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus eternos orientadores Dr. Francisco Aragão e Dr. Elíbio Rech, pela amizade, dedicação, paciência e confiança para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Giovanni Vianna, pela amizade, apoio e discussão ao longo da realização deste trabalho.

À minha orientadora do doutorado sanduíche, Dra. Gabriela Cezar, por todo apoio e ensinamentos inéditos em minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial, Nicolau, Emanuel, Kenny, Érica, Maria Laine, Aline, Bárbara, Daniela, Well, Angélica, Thaís, Gustavo, Sérgio, Elsa, Luís, Warley.

Às amigas Natalie e Maricy, pela confiança, incentivo e pelos momentos de felicidade pelos quais passamos ao longo de nosso convívio.

A todos os amigos da área de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos, pela amizade e companheirismo.

Ao pessoal da limpeza e de apoio, pelo essencial auxílio.

Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília pela oportunidade de ingresso neste conceituado curso.

À Universidade de Wisconsin – Madison – pela oportunidade dada para a complementação de meu aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão das bolsas de estudo.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília e aos pesquisadores da Embrapa, pelos preciosos ensinamentos.

Aos colegas do curso de doutorado em Biologia Molecular, pelo companheirismo.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) – Brasília/DF, pela disponibilização das instalações físicas, equipamentos, e capacitação de recursos humanos.

Ao meu sempre orientador Jefferson Aparecido Guilen Soares (*in memoriam*), sem o qual não traçaria o meu destino vinculado à Reprodução Animal.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos, porque se superei mais esta etapa, o mérito é também de vocês, e portanto essa vitória não é minha, mas nossa.

# Índice

<b>ÍNDICE</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
REVISÃO DE LITERATURA .....	19
OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS .....	23
METODOLOGIA .....	25
RESULTADOS OBTIDOS NO PROJETO .....	25
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	27
Introdução .....	27
Material e Métodos .....	31
Resultados e Discussão .....	33
Publicação 1 .....	37-45
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	46
Introdução .....	46
Material e Métodos .....	54
Resultados e Discussão .....	61
Publicação 2 .....	Anexo
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	63
Introdução .....	64
Cronograma das Atividades .....	69
Objetivos .....	70
Resultados .....	70
Metodologia .....	72
Discussão .....	89
Conclusão .....	93

<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	95
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	103
<b>ANEXOS</b> .....	119
Publicação 2: Lisauskas et al., 2007 .....	
Publicação 3: Oliveira et al., 2005 .....	
Publicação 4: Oleskovicz et al., 2004 .....	
Código Genético e Proteína Fator IX .....	

# Índice de Figuras e Tabelas

## CAPÍTULO 1

Figura 1	34
Figura 2	35
Figura 3	35
Tabela 1	36

## CAPÍTULO 3

Figura 1	73
Figura 2	74
Figura 3	77
Figura 4	79
Figura 5	80
Figura 6	85
Figura 7	87
Figura 8	88
Tabela 1	81

## RESUMO

A crescente demanda por biomoléculas de interesse farmacológico tem levado ao desenvolvimento de sistemas adicionais para a sua produção em larga escala e sob custos mais reduzidos. Sistemas de expressão utilizando células de eucariotos superiores vêm sendo apontados como possíveis alternativas para a produção de proteínas de interesse farmacológico (Leite, 2000). A secreção desses polipeptídeos no leite de animais transgênicos possibilita não apenas altos rendimentos de produção de fármacos heterólogos como também a ocorrência de seu processamento e modificações pós-traducionais de modo correto (Kerr *et al.*, 1996). De maneira complementar, a produção desse tipo de biomolécula em sistemas eucariotos tem apresentado características interessantes tanto com relação à manutenção de seu processo de síntese, enovelamento e processamento, quanto à significativa redução de custos, aumento de estabilidade, manutenção de atividade biológica e ausência de contaminantes e patógenos comuns aos humanos (Kusnadi *et al.*, 1997). O fator IX de coagulação sangüínea é uma glicoproteína da classe das serino-proteases que apresenta massa molecular de aproximadamente 55kDa. O polipeptídeo é sintetizado no fígado e secretado posteriormente no sangue, em que participa de uma cascata complexa de reações envolvendo mais três fatores de coagulação e duas proteínas: a pró-trombina e o fibrinogênio, culminando à coagulação sangüínea (Thompson *et al.*, 1986).

Alterações genéticas que ocasionam a disfunção ou a ausência de síntese do FIX resultam na hemofilia B, doença recessiva ligada ao cromossomo X que afeta cerca de 1 em cada 10.000 homens no Brasil.



No presente trabalho foram desenvolvidas linhagens de camundongos (*Mus musculus*) transgênicos, microinjetados com o gene do *fator IX de coagulação humana*. As camundongas fundadoras, bem como suas progêneses secretaram no leite o FIX recombinante (3% proteínas solúveis totais). A integração estável do transgene - sob controle do promotor da  $\beta$ -caseína do leite - foi verificada por *southern blot*, e a presença do FIX no leite de fêmeas transgênicas verificada por *western blot*. Testes de atividade da proteína recombinante em amostras de sangue de hemofílicos do tipo B foram realizados com auxílio de coagulômetro, comprovando a bioatividade da proteína.

A expressão do fator IX de coagulação humana biologicamente ativa em camundongos transgênicos (Eyestone, 1994; Damak et al., 1996; Lisauskas et al., 2008) justifica a aplicabilidade dos sistemas em bovinos transgênicos utilizados como biofábricas (Lisauskas et al., 2007; Iguma et al, 2005).

**Palavras-chave:** Animais transgênicos, camundongos transgênicos, fator IX recombinante, animais como biorreatores, fator IX humano

## ABSTRACT

The increasing demand for production of pharmaceutical interest recombinant proteins has been the goal for the development of additional systems to its production on a large scale and reduced costs. Eukaryotes expression systems are possible alternatives to the production of recombinant protein (Leite, 2000). The secretion of these polypeptides in the milk of transgenic animals promised high level of heterologous pharmaceutical products as well as the correct process and post-translation modifications (Kerr et al., 1996). The production on eukaryotic systems has presented characteristic interesting in such a way with regard to the maintenance of its process of synthesis, envelopment and processing, and to the significant reduction of costs, increase of stability, maintenance of biological activity, absence of contaminants and pathogens to the humans (Kusnadi et al., 1997). Blood coagulation factor IX is a serine-protease glycoprotein and it presents molecular mass of 55kDa. The polypeptide is synthesized in the liver and secreted in the blood, where it participates of reactions group involving coagulation factors and proteins that permit the blood coagulation (Thompson et al., 1986). Genetic alterations that cause the dysfunction or the absence of synthesis of the *FIX* lead to the hemofilia B, a recessive illness linked to chromosome X which affects about 1 in each 10,000 men in Brazil. In this work two lineages of mice (*Mus musculus*) were microinjected with the *human coagulation factor IX* gene. The founding females and its progenies secreted the recombinant FIX in their milk (3% Total Soluble Protein). The stable integration of transgene - under control of the milk  $\beta$ -casein pBC1 promoter - was confirmed by southern blot analysis. The presence of the

FIX recombinant protein in the milk of transgenic females was verified by western blot. Tests of its activity in B hemophilic blood samples were confirmed by coagulometer pattern, validating this heterologous system.

**Keywords:** Transgenic animal, transgenic mice, recombinant factor IX, animal as bioreactor, human factor IX

## INTRODUÇÃO

Um animal transgênico, segundo a definição da Federação Européia das Associações de Ciência em Animais de Laboratório, é "um animal que possui seu genoma modificado artificialmente pelo homem, quer por meio da introdução, quer da alteração ou da inativação de um gene (uma seqüência definida de DNA). Esse processo deve culminar na alteração da informação genética contida em todas as células desse animal, até mesmo nas células germinativas (óvulos e espermatozóides), fazendo com que essa modificação seja transmitida aos descendentes".

O método mais utilizado para introdução de genes é a transgenia por adição, por meio do qual é inserida no genoma uma ou várias cópias de um gene de interesse - daí suas outras denominações: adição gênica e modelo de superexpressão de genes. O gene adicionado pode ser endógeno ou exógeno. O primeiro tipo já existe no genoma do animal. Este é usado quando se quer produzir uma quantidade maior da proteína codificada já existente, aumentando a quantidade de sua cópia no genoma. Genes exógenos pertencem à outra espécie e são usados para fazer um animal produzir uma nova proteína, ausente na forma desejada na espécie receptora.

Os primeiros sucessos da utilização da tecnologia do DNA recombinante na produção de proteínas em sistemas heterólogos, foram demonstrados por meio da produção comercial de hormônios e vacinas em microrganismos e/ou células em cultura. Entretanto, existem limitações para a produção de algumas proteínas recombinantes em sistemas bacterianos devido ao não processamento pós-traducional de maneira a produzir moléculas biologicamente ativas. Em outros

casos, as proteínas de interesse estão em forma de agregados, e não podem ser facilmente recuperadas. Como opção, diferentes proteínas recombinantes têm sido produzidas em células animais. Fermentadores contendo hibridomas, células CHO entre outros, têm sido extensivamente utilizados para a produção de anticorpos contra Hepatite B, eritropoietina, fator VIII etc. Apesar de eficientes, esta estratégia possui algumas limitações intrínsecas. Dentre estas, a principal está na impossibilidade de produção em larga escala. Isto se deve principalmente porque os fermentadores contêm um limitado número de células, as quais são mantidas em condições metabólicas sub-ótimas. Fermentadores com alta capacidade podem produzir proteínas recombinantes em larga escala, mas não a baixo custo.

Na tentativa de avanços tecnológicos na área de produção de proteínas recombinantes, surgem tecnologias adicionais para a produção de proteínas de interesse econômico em larga escala de produção. Animais transgênicos (Wall, 1996; Houdebine, 1994) e plantas transgênicas (Kusnadi et al., 1997; Leite et al., 2000.) têm demonstrado ser altamente eficientes para a produção de proteínas recombinantes biologicamente ativas, em larga escala e sob custos mais reduzidos.

A utilização de um camundongo transgênico expressando uma proteína recombinante validou a hipótese da utilização de animais como biorreatores (Lisauskas et al., 2008; Choo et al., 1987; Simons et al., 1987; Palmiter et al., 1982). Para a produção em larga escala, a demonstração foi dada em 1993, por meio da produção de proteínas recombinantes na espécie ovina (Carver et al., 1993; Wright and Colman, 1997). Estes resultados foram confirmados por meio da produção experimental de dezenas de proteínas recombinantes no leite de

diferentes espécies animais (Rudolph, 1999; Clark, 1998; Wall, 1999; Eyestone, 1994).

O leite contém proteínas que são naturalmente expressadas pela glândula mamária durante a lactação. As duas principais categorias de proteínas produzidas no leite envolvem as caseínas e proteínas solúveis. Os genes codificantes para algumas destas proteínas foram clonados e os elementos reguladores que controlam os locais de expressão tecido-específico e temporal foram caracterizados. Em nosso vetor de expressão construído, a seqüência codificante do gene de interesse, o gene do *fator IX humano de coagulação sanguínea*, foi construída ligada a um promotor que direcionou a expressão do produto gênico para as glândulas mamárias de camundongas. Neste projeto, o Laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) – Brasília – DF, em parceria com a Universidade de Brasília – UnB e a Universidade Federal Paulista – UNIFESP, desenvolveram camundongas transgênicas expressando o fator IX de coagulação humana no leite. Os camundongos geneticamente modificados foram produzidos com base na técnica de microinjeção do vetor de expressão diretamente nos pró-núcleos masculinos, gerando linhagens germinativas geneticamente modificadas (Lisauskas et al., 2008). Estudos foram conduzidos para avaliar a presença do transgene introduzido tanto na matriz quanto na progênie, utilizando PCR e *southern blot*, além de análises da expressão do fator no leite das camundongas (*western blot*). A validação desse sistema heterólogo por meio da produção dessa proteína recombinante foi confirmada por ensaios de bioatividade da proteína recombinante purificada do leite, demonstrando sua atividade e a capacidade de coagulação da proteína (fator IX humano) em sangue de

pacientes hemofílicos. O Hospital de Apoio de Brasília foi o responsável pelos bioensaios da proteína recombinante.

Após a validação do sistema heterólogo de produção de proteínas recombinantes no leite dos animais gerados como modelos experimentais, o próximo passo foi atingir a produção em larga escala. Células animais transfectadas e devidamente caracterizadas têm sido utilizadas como fontes doadoras de seus núcleos para a síntese de proteínas em animais de grande porte. Neste contexto, as espécies de caprinos e bovinos são candidatas importantes para a produção de proteínas recombinantes devido à alta capacidade de produção de leite e conseqüentemente de proteína recuperada (McCreath et al., 2000; Yull et al., 1997).

A possibilidade de se utilizar células animais somáticas transfectadas – fibroblastos bovinos - (Iguma et al., 2005; Egilmez et al., 1996; Friend et al., 1996; Felgner et al., 1989) como doadoras dos núcleos para a transferência nuclear abriu uma nova perspectiva para a geração de bovinos e ovinos transgênicos (Cibelli et al., 1998; Carver et al., 1993). McCreath et al. (2000) produziram um ovino transgênico a partir da transferência nuclear de fibroblastos fetais, transformados com o vetor linearizado COLT-2, o qual induziu a expressão da proteína alfa-antitripsina no leite de ovelhas.

Entretanto, muitos desafios técnicos ainda necessitam ser superados e os processos precisam ser desenvolvidos e otimizados nas áreas de: células de eleição como doadoras dos núcleos transgênicos para a transferência nuclear; introdução no genoma e expressão dos transgenes a nível desejado; aumento das taxas de embriões reconstruídos e as taxas de gestação de embriões transgênicos (Lisaukas et al., 2007; Iguma et al., 2005; Rudolph, 1999; Wall,

1999; Clark, 1998.) O conhecimento dos fenômenos envolvidos na integração e na segregação de genes exógenos em animais transgênicos, principalmente nos de grande porte, é fundamental para o futuro controle destes processos (Stinnakre et al., 1999).

A fim de aperfeiçoar o processo de geração de bovinos transgênicos, Saito et al. (2003) modificaram geneticamente células-tronco embrionárias bovinas e conseguiram resultados superiores na produção e desenvolvimento de embriões após a transferência nuclear, quando comparado com a utilização de células somáticas (fibroblastos) geneticamente modificadas como doadoras de núcleos transgênicos.

O presente trabalho propôs a modificação genética de células bovinas para serem modelos de estudos para a futura geração de linhagens de células doadoras aptas à produção de bovinos transgênicos. Com base na estratégia da transfecção de fibroblastos isolados de tecido adulto (Oliveira et al., 2005; Oleskovicz et al., 2004), foram geradas linhagens celulares bovinas MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) com inserções não-deletérias do transgene e variáveis níveis de expressão (Fujiwara et al., 1999; Fujiwara et al., 2003; Forsbach et al., 2003; Lisauskas et al., 2007). Os sítios de integração dos transgenes nos cromossomos que propiciam sua expressão não estão bem caracterizados, mas acredita-se ser regiões transcricionalmente ativas da eucromatina (Day et al., 2000). No estado de heterocromatina os fatores transcricionais são inacessíveis, e freqüentemente está relacionado à hipermetilação por citosinas e à hipoacetilação pelas histonas (Ng and Bird, 1999). A consequência direta desta configuração da cromatina é que transgenes que se integram randomicamente às proximidades da heterocromatina



freqüentemente apresentam níveis mais baixos de expressão (Dobie et al., 1996). Com os estudos feitos neste trabalho, foi possível estabelecer linhagens clones transfectadas de células MDBK bovinas, gerando eventos elites quanto ao local de integração do transgene no genoma, e quanto à detecção da expressão estável destes transgenes nessas linhagens. A aplicação futura dessa caracterização pode funcionar como modelo de integração de outros vetores de expressão no genoma bovino, utilizando-se genes-alvo (“gene targeting”), para a transformação genética das células doadoras de núcleos transgênicos para a reconstrução embrionária após a transferência nuclear. Segundo Iguma et al. (2005) a transferência de núcleo baseia-se na geração de animais transgênicos com genótipo preestabelecido. Os animais clones bovinos são produzidos a partir de células geneticamente modificadas, utilizadas como fontes doadoras de núcleos transformados e microinjetadas em ovócitos previamente enucleados. O embrião transgênico gerado segue para a transferência em vacas receptoras (Cibelli et al., 1998; Schnieke et al., 1997; Campbell et al., 1996).

Entretanto, a fim de aumentar a eficiência de produção de embriões transgênicos reconstruídos após a transferência nuclear (TN) e aumentar as taxas de prenhez desses embriões, deve ser utilizada a estratégia da transfecção de células-tronco isoladas de embriões bovinos (Li Wang et al., 2005). Segundo Saito et al. (2003) sete embriões provenientes de células-tronco geneticamente modificadas foram transferidos para sete animais receptores e cinco fetos (71%) foram confirmados. A taxa de freqüência de gestação (71%) e de animais nascidos provenientes de blastocistos derivados de células-tronco geneticamente modificadas foram maiores que as taxas de gestações geradas a partir de células somáticas (aproximadamente 55%), reportadas após a TN. O

desenvolvimento dos sistemas para a geração de bovinos transgênicos (Saito et al., 2003; Li Wang et al., 2005) visam ao aprimoramento da produção de embriões transgênicos utilizando células-tronco embrionárias bovinas como doadoras de núcleos geneticamente modificados. No nosso estudo, foram estabelecidas cinco colônias de células-tronco embrionárias bovinas para serem futuramente transfectadas *in vitro*, e funcionarem como fontes doadoras de núcleos transgênicos, a fim de aumentar tanto as taxas de reconstrução embrionária pós-TN, quanto às taxas gestacionais pós-transferência de embriões (TE).

A utilização de animais transgênicos deverá permitir a expressão de proteínas com estruturas complexas, estabilidade e atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, consistência da produção entre os diferentes animais e entre gerações, além de possibilitar a produção de algumas proteínas que ainda não foram produzidas utilizando outros sistemas. Pode-se conseguir uma eficiente produção de dezenas de gramas da proteína recombinante por litro de leite, chegando a quilogramas por ano. Um aumento de produtividade entre 10-1000 vezes, produção em larga escala de maneira mais econômica, e reduzido investimento quando comparado aos sistemas de células em cultura. Sistemas de produção que utilizam células em cultura podem produzir no máximo 1-2 gramas, ou mais tipicamente 100-200 mg por litro por dia (Wright and Colmann, 1997; Van Cott et al., 1996; Denman et al., 1991; Gordon et al., 1987). Comparando-se com uma cabra: sua produção diária de leite é tipicamente 2-4 litros, contendo 10 ou mais gramas de proteína recombinante por litro, podendo esta prover mais matéria prima de proteína recombinante do que um biorreator de 1000 litros (Denman *et al.*, 1991).

## REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, a utilização de animais transgênicos tem demonstrado ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em larga escala e custos mais reduzidos, os quais têm recebido aceitação pelas agências de regulamentação responsáveis pela produção de fármacos. As principais plataformas tecnológicas existentes em relação à utilização de animais como biofábricas estão restritas a alguns Institutos de Pesquisa e Empresas Privadas situados nos Estados Unidos e Europa. Na Argentina, cinco animais bovinos geneticamente modificados com o gene do hormônio de crescimento humano produzidos no leite foram gerados pela empresa privada Bio Sidus no período de 2002 a 2004. Segundo esta empresa, um único animal pode chegar a produzir 15 gramas de proteína por dia, e meio quilo por mês. Cada dose recebida por um paciente contém pouco mais de 1 mg de hormônio de crescimento de máxima pureza. É fundamental o estabelecimento dos sistemas requeridos para a efetiva produção de proteínas recombinantes no leite de animais transgênicos na América Latina, como uma das estratégias tecnológicas.

A utilização de transgênicos para a produção de proteínas recombinantes deverá prover uma fonte segura, renovável e efetiva para a produção de proteínas biologicamente ativas, as quais somente estariam disponíveis por meio da utilização de células do sangue, tecidos ou biorreatores. A utilização da tecnologia de transgênicos é especialmente atrativa para a produção de proteínas recombinantes necessárias em larga escala. Isso se dá devido às unidades de dosagens requeridas, administrações múltiplas, aplicação em larga

escala na população, ou necessidade de produção industrial. Além disso, a utilização de animais transgênicos permite expressar proteínas bioquimicamente complexas que não podem ser produzidas de forma economicamente viável em cultura de células. O significativo baixo custo em capital e custos operacionais para a produção de compostos não processados, fazem com que os transgênicos tenham um custo mais efetivo do que outros sistemas de produção de proteínas recombinantes.

Algumas das vantagens da produção de proteínas recombinantes utilizando transgênicos são: leite como fonte de matéria prima não processada segura, abundante, renovável, de fácil obtenção e de boa aceitação pública; possibilidade da produção de proteínas heterólogas com estruturas complexas; estabilidade da proteína e atividade biológica *in vitro* e *in vivo*; produção consistente entre as diferentes gerações dos animais; eficiência de produção: dezenas de gramas da matéria prima por litro de leite, muitos quilogramas de proteínas por animal (cabra, ovelha, bovino) por ano, níveis de produtividade de 10 a 1000 vezes maiores do que sistemas de células em cultura; recuperação e purificação da proteína em grandes quantidades e alta concentração da proteína na matéria prima inicial / kg de leite.

Neste contexto, a espécie bovina é a eleita para a produção de proteínas recombinantes devido ao alto nível de produção de leite e proteína, ambos aceitos como fontes de dieta. O leite dos bovinos tem sido extensivamente caracterizado a nível bioquímico, fato que facilita o desenvolvimento das etapas subseqüentes para a purificação das proteínas recombinantes. Além disso, existe a possibilidade do desenvolvimento de espécies transgênicas para aplicações específicas, como vacas para a produção em grande quantidade

(toneladas) ou coelhos e camundongos para produção de pequenas quantidades de proteínas requeridas em menor escala, ou simplesmente como modelo de estudo para a expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos (Lisauskas et al., 2007).

A glândula mamária pode ser considerada atualmente o melhor biorreator disponível (Colman, 1996; Rudolph, 1999). Estudos extensivos têm demonstrado a possibilidade da produção de uma grande variedade de proteínas recombinantes no leite, muitas delas, sendo proteínas complexas, como: IGFI humano (Zinoveiva et al., 1998), hGH (Devinoy et al., 1994), lisozima humana (Lee et al., 1998), lactoferrina humana (Platenburg et al., 1994), eritropoietina humana (Sohn et al., 1999), hormônio da paratireóide humano (Rokkones et al., 1996). Estes exemplos demonstram a capacidade da glândula mamária para sintetizar, maturar e secretar proteínas recombinantes.

Em termos econômicos, existe um mercado global em expansão para diferentes classes de proteínas recombinantes expressas no leite. Algumas vezes a demanda excede 100 kg. O mercado anual para antitrombina III, utilizada no tratamento da deficiência (hereditária), é de aproximadamente 70 Kg, a um custo de US\$ 2000-6000 o grama, segundo a IMS America Ltd. (Plymouth Meeting, MA). No caso da alfa-antripsina, indicada para o tratamento da fibrose cística, o mercado se aproxima de US\$ 30-50 milhões, sendo que 350 Kg são utilizados somente nos Estados Unidos, de acordo com a IMS. Para as proteínas provenientes do plasma humano, fator VIII e IX, o mercado anual é de aproximadamente 5-10 kg. De acordo com World Federation of Hemophilia (Montreal, Canada), a venda atual de fator IX é de aproximadamente US\$190 milhões nos Estados Unidos. O Fator VIII é de aproximadamente US\$ 2 bilhões.

O mercado potencial para os produtos mencionados tem sido limitado pelo suprimento de plasma. No Brasil, segundo o Hospital de Apoio de Brasília – DF, todo o fator que é comprado no país é importado. Um frasco do remédio custa cerca de US\$ 100, sendo que cada paciente chega a utilizar 20 frascos por semana.

A etapa final do processo, que consiste na purificação das proteínas recombinantes do leite geralmente não apresenta dificuldades particulares. Entre os possíveis contaminantes biológicos, os *prions* são os que podem apresentar problemas. Entretanto, existem evidências homologadas, inclusive pela World Health Organization, enfatizando que *prions* não têm sido detectados em associação com leite e sêmen (Rudolph, 1995; Ziomek, 1996). Além disso, recentemente, rebanhos produtores de proteínas recombinantes direcionados à comercialização requerem sistemas fechados de controle sanitário no intuito de erradicar as possíveis contaminações por *prions* provenientes desses animais controlados (Gavin, 2001).

Esta plataforma tecnológica deverá formar a base fundamental para a futura utilização de diferentes seqüências regulatórias e codificantes, prospectadas e devidamente caracterizadas, por meio de projetos de análise genômica funcional e de proteomas. Como consequência direta, irá possibilitar um cenário de efetiva aplicação da manipulação da tecnologia do DNA recombinante para a geração de produtos em benefício da nossa sociedade.

## **OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS**

O objetivo geral do projeto consistiu no desenvolvimento de um modelo experimental para a produção de biomoléculas de interesse farmacêutico utilizando animais transgênicos como biofábricas.

Essa base tecnológica consistiu:

1) na transfecção de linhagens germinativas de camundongos – Capítulo 1 – como modelo experimental animal para futura geração de bovinos transgênicos como biofábricas;

2) na transfecção de linhagens de células somáticas bovinas – Capítulo 2 - como modelo de estudos da integração adequada dos transgenes e seleção das potenciais linhagens doadoras de núcleos transgênicos para a transferência nuclear;

3) na obtenção de células-tronco embrionárias bovinas – Capítulo 3 - para servirem como linhagens doadoras de núcleos transgênicos a fim de aprimorar as taxas de reconstrução embrionária pós-transferência nuclear e as taxas de gestação a partir do uso de embriões bovinos transgênicos.

Os objetivos específicos desse trabalho foram descritos e discutidos nos artigos científicos pertinentes aos seus respectivos Capítulos:

**CAPÍTULO 1: EXPRESSÃO DO FATOR IX DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA HUMANA EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS DE CAMUNDONGAS (*Mus musculus*)**

1) Geração de camundongos transgênicos pela técnica de microinjeção pronuclear:

- Publicação 1: Lisauskas et al., 2008.

2) Análises de integração, expressão gênica e bioatividade da proteína recombinante produzida no leite das camundongas transgênicas.

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE INTEGRAÇÃO DE TRANSGENES EM GENOMA BOVINO**

1) Lipofecção *in vitro* de células MDBK, isolamento e expansão de linhagens clones para estudos do transgene:

- Publicação 2: Lisauskas et al., 2007.

2) Estudos dos locais de integração no genoma hospedeiro e expressão dos transgenes.

**CAPÍTULO 3: ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS.**

1) Desenvolvimento de um sistema eficiente de isolamento, expansão e criopreservação de linhagens de células-tronco embrionárias bovinas utilizadas como fontes potenciais de doação de núcleos transgênicos.



## **METODOLOGIA**

O Material e Métodos dos Capítulos 1, 2 e 3 estão descritos ou no capítulo referente ou no respectivo artigo científico publicado.

## **RESULTADOS OBTIDOS NO PROJETO**

- 1)** Desenvolvimento do vetor de expressão contendo: a) promotores específicos de glândula mamária como o promotor da beta-caseína controlando genes responsáveis pela produção da biomolécula recombinante (seqüências que codificaram para a produção do fator IX de coagulação sangüínea humana) e b) promotores constitutivos controlando genes marcadores e de seleção.
  
- 2)** Modificação genética de linhagens germinativas de camundongos por microinjeção do vetor de expressão em pronúcleo masculino (taxa de eficiência de 6%).
  
- 3)** Obtenção, purificação por centrifugação e bioensaios do fator IX de coagulação sangüínea humana no leite das camundongas transgênicas, por meio de técnicas de bioatividade (parâmetros coagulométricos) da proteína recombinante.

**4)** Isolamento e desenvolvimento de colônias clones bovinas transfectadas - MDBK - para estudos de integração e expressão gênica; e seleção de eventos aptos e não-aptos para a geração de bovinos transgênicos.

**5)** Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias bovinas aptas à transfecção *in vitro*.

# CAPÍTULO 1: EXPRESSÃO DO FATOR IX DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA HUMANA EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS DE CAMUNDONGAS (*Mus musculus*).

(Production of a recombinant human factor IX in milk of mice)

## INTRODUÇÃO

Hemofilia é um distúrbio genético da coagulação que faz com que o sangue não forme um efetivo coágulo. Na ausência desse coágulo, injúrias internas e lacerações externas são incapazes de serem resolvidas de maneira correta. Hemofilia A e B são herdadas geneticamente como distúrbios recessivos ligados ao sexo (Cromossomo X) e ocorre quase que exclusivamente em homens na ordem de 1 em cada 5000 nascidos nos Estados Unidos e Canadá. Aproximadamente 13,5 mil americanos têm hemofilia A (também denominada de hemofilia clássica), em que o fator VIII de coagulação está ausente ou não é produzido em quantidades suficientes. Já 3,5 mil pessoas nos Estados Unidos têm hemofilia B (também denominada Christmas disease), em que o fator IX de coagulação está ausente ou não está presente em quantidades suficientes. No Canadá, cerca de 2000 pessoas têm hemofilia A e 450 têm hemofilia B. No Brasil, existe uma incidência estimada de 1 em cada 10000 habitantes, sendo que 85% dos pacientes têm hemofilia A e 15% têm hemofilia B.

Enquanto a hemofilia pode resultar de uma mutação genética espontânea, é mais freqüentemente apresentada como um distúrbio hereditário. Essa doença é causada por uma deleção ou uma mutação do gene que modifica a habilidade

do organismo de produzir quantidades suficientes de fatores para promoverem a coagulação. Esta cascata age por duas vias, e visa à formação de um coágulo sempre que um vaso é lesado, impedindo que o sangue extravase pela lesão indefinidamente. As pessoas afetadas por esta doença não produzem um dos dois fatores importantes para que esta cascata seja eficaz, o fator VIII ou o fator IX. Assim, são incapazes de coagular o sangue.

Até hoje, o tratamento para esta doença é a injeção destes fatores que faltam (o VIII ou o IX), por meio de derivados do sangue de doadores sadios ou fabricados por engenharia genética. Estes fatores, porém, são muito instáveis, exigindo injeções freqüentes.

A hemofilia é caracterizada como grave quando a atividade do fator de coagulação implicado é menor do que 1% do normal. Isso freqüentemente resulta em sangramento espontâneo. A doença é leve quando a atividade é maior do que 5% do normal e moderada quando a atividade do fator de coagulação encontra-se entre esses dois valores. Cerca de 50% dos pacientes hemofílicos têm doença grave ou moderada e necessitam de tratamento para as hemorragias graves, desde várias vezes ao mês até poucas vezes por ano.

Normalmente, os pacientes que sofrem de hemofilia B são tratados com fator IX obtido a partir do plasma humano de pacientes sadios. Mas a administração de derivados do sangue em pacientes apresenta alto risco de contaminação por agentes infecciosos, como hepatite, AIDS, infecções por bactérias e parasitas. Por esse motivo, em vários países do mundo vem crescendo significativamente o emprego dos produtos obtidos por engenharia genética. No Canadá, por exemplo, uma lei exige, desde 1995, que apenas

fatores de coagulação sangüínea deste tipo sejam comercializados, em detrimento dos hemoderivados.

Até a década de 90, as tecnologias para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico se restringiam à cultura de células de mamíferos *in vitro* ou produção em microorganismos. A partir daí, a utilização de animais transgênicos demonstrou ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em larga escala e custos mais reduzidos (Houdebine, 1994; Wall, 1996).

Várias são as aplicações da tecnologia da transgênese animal. Segundo Axelrod et al. (1990) foi demonstrado que células primárias de fibroblastos de pele de cães hemofílicos, transfectadas por retrovírus contendo cDNA do fator IX de coagulação, secretaram altos níveis do fator IX biologicamente ativo no meio de cultura em que as células estavam sendo cultivadas. Já Choo et al. (1987) produziram camundongos transgênicos pela microinjeção de cDNA de fator IX humano nos pronúcleos de ovócitos pré-fertilizados. Os camundongos transgênicos expressaram altas taxas do mRNA e atividade de coagulação ativa, que foram indistinguíveis da atividade do fator IX provenientes do plasma normal humano.

Esses dados demonstram a capacidade de expressão de proteínas recombinantes altamente complexas em camundongos transgênicos. Além de servir como *background* para a produção de fator IX humano em animais de grande porte (Schnieke et al., 1997; Cibelli et al., 1998) e em larga escala de produção, para aplicação terapêutica e de terapias gênicas para a hemofilia B.

Em nosso estudo, a fim de comprovar a eficiência da atividade do fator IX humano recombinante, bioensaios foram conduzidos com a proteína

recombinante purificada por centrifugação do leite de camundongas transgênicas. O Laboratório de Hematologia da Unidade do Hospital de Apoio de Brasília - DF – conduziu os experimentos de bioatividade do recombinante na sua ação coagulante, demonstrando que a função da proteína recombinante não é perdida quando produzida em sistemas heterólogos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Vetor de expressão

A construção do vetor de expressão foi efetuada de acordo com procedimentos padrões da tecnologia do DNA recombinante (Sambrook et al., 1989) e utilizada na transformação genética de linhagens germinativas de camundongos por meio da técnica de microinjeção do vetor de expressão nos pronúcleos masculinos dos embriões.

A região codificadora do gene do *fator IX humano* (XM\_010270.4) (Yoshitake *et al.*, 1985) (Anexos) foi fusionada ao sinal de secreção da beta caseína bovina (MAKVLILACLVALALA) por meio da técnica de PCR, utilizada como primer 5'. Esse oligonucleotídeo 5' incluiu a seqüência codante do sinal de secreção da beta caseína bovina, além das enzimas de restrição do sítio de clonagem do vetor de expressão pBC1 (Invitrogen, EUA). O produto dessa PCR foi clonado no sítio de restrição de *XhoI* do vetor expressão comercial pBC1 (Invitrogen, EUA). Esse vetor comercial possui 21.6 Kb e foi elaborado pela empresa fabricante para facilitar a expressão de proteínas recombinantes no leite de animais transgênicos.

O plasmídeo resultante foi amplificado em linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e purificado segundo Kit de Purificação de Plasmídios Giga da Quiagen (Quiagen, Valencia, CA, USA). A concentração do DNA plasmidial após a purificação em coluna Quiagen foi mensurada por absorbância sob Ultra Violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A pureza do plasmídeo foi assegurada segundo corrida em gel de agarose a 1% e mensuração da relação A260/A280

em espectrofotômetro. O vetor foi seqüenciado para ser usado nos experimentos.

### **Geração de camundongos transgênicos**

Para a produção dos camundongos transgênicos, o gene exógeno foi inserido na linhagem germinativa pela microinjeção no pronúcleo masculino de um óvulo pré-fertilizado segundo Chrenek *et al.* (2007).

### **Recuperação e Purificação da proteína**

A purificação do produto gênico produzido no leite das camundongas transgênicas foi realizada por meio da centrifugação em que houve a separação da fase lipídica e da fase protéica do leite. Esta recuperação visou à obtenção de uma alta concentração da proteína purificada da matéria prima inicial para análise de bioatividade de maneira fidedigna.

### **Análises da integração e expressão gênica**

Análises moleculares (PCR, *southern blot* e *western blot*) e bioensaios foram conduzidos a fim de detectar linhagens transgênicas, a expressão da proteína recombinante no leite dos animais e sua atividade coagulante.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Animais transgênicos são capazes de produzirem proteínas recombinantes biologicamente ativas em altos níveis de expressão (Choo et al., 1987). Com o uso do vetor de expressão pBC1 (Invitrogen, EUA), específico para transformação genética de células animais, as proteínas recombinantes são secretadas em altos níveis no leite desses animais. Baseado nisto, nossa construção (Fig. 1) foi um vetor integrativo que confere transformação estável no genoma hospedeiro e expressão do recombinante no leite dos animais transformados. A integração e expressão foram detectadas por *southern blot*, *western blot* e ensaios de bioatividade da proteína.

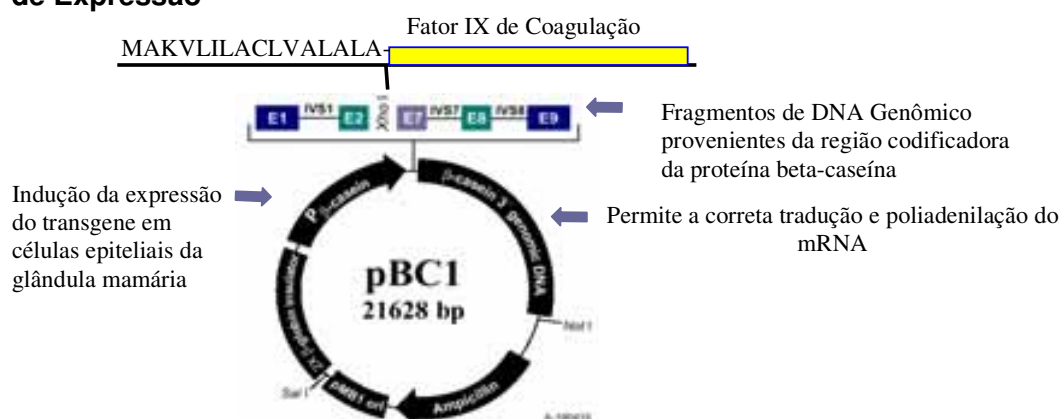
Nós utilizamos o método de microinjeção pró-nuclear para a geração dos camundongos transgênicos. Esta é a tecnologia mais eficiente usada na modificação genética por adição de genes em camundongos (Watanabe et al., 2007) quando comparada com outros sistemas de transformação (Huszar et al., 1985; Jahner et al., 1985; Lavitrano et al., 1989). Nossa taxa de eficiência de transfecção foi 6% considerando a presença de dois fundadores em 34 progênes. Entretanto, esta tecnologia tem sido provada ser de baixa eficiência quando de sua aplicação em animais de grande porte (Wall et al., 2001).

Uma vez que a técnica de microinjeção pró-nuclear resulta em inserções randômicas e variáveis níveis de expressão, até onde se sabe, os camundongos transgênicos foram avaliados por PCR e *southern blot* a fim de detectar a presença da introdução do transgene nos animais fundadores e em sua progênie (Fig. 2).

Análises de *western blot* confirmaram a presença da correta massa molecular da proteína recombinante no leite dos camundongos transgênicos, certificando a correta estratégia de transformação quando utilizado o nosso vetor de expressão, baseado na utilização do sinal de secreção da beta-caseína (Fig. 3).

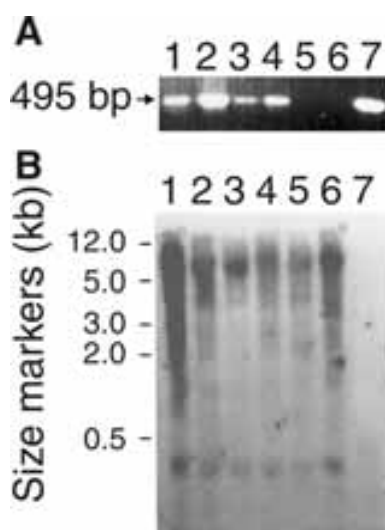
A fim de comprovar a atividade da proteína recombinante em sua ação coagulante, o leite dos animais fundadores da linhagem 01, da linhagem 02, plasma humano normal, plasma humano hemofílico, e leite de fêmeas não-transgênicas foram comparados. A atividade de coagulação detectada em mU/ml (mili-unidades/mililitros) foi 17, 31, 44, 7 e 0, respectivamente. O tempo de coagulação foi estimado em 76, 69, 37.6, 87 e 141 segundos, respectivamente. A atividade da proteína foi estimada em porcentagem de sua ação coagulante (Tabela 1).

### Vetor de Expressão



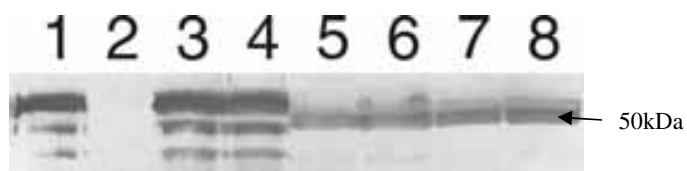
**Figura 1.** Vetor de expressão pBC1FIX usado para a geração dos camundongos transgênicos. A seqüência codante do gene *FIX* humano foi fusionada ao sinal de secreção de beta-caseína bovina (MAKVLILACLVALALA) e clonado no sítio de restrição de *Xho*I do vetor de expressão comercial pBC1 (Invitrogen, EUA).

## Transfecção Integrativa



**Figura 2.** (A). Avaliação por meio de PCR nos camundongos transgênicos. 1, 2, 3, 4 correspondem aos camundongos transgênicos; 5 camundongos não-transgênicos; 6 controle negativo interno das reações; 7 sequência do gene do *FIX* correspondente a 495 pb. (B). Análises de *southern blot* das linhagens transgênicas 1 e 2 (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e da linhagem não-transgênica (7).

## Expressão do transgene



**Figure 3.** *Western blot* do leite de fêmeas transgênicas expressando o gene fo *FIX* humano. 1 corresponde a 350 ng da proteína do *FIX* purificada (Sigma, EUA); 2 corresponde a 100  $\mu$ g de proteína total de leite de fêmea não-transgênica; 3 e 4 a 100  $\mu$ g de fêmeas fundadoras transgênicas das linhagens 1 e 2; 5 e 6 a 100  $\mu$ g da progênie F<sub>1</sub> da linhagem 1; 7 e 8 a 100  $\mu$ g da progênie F<sub>1</sub> da linhagem 2.

## Bioatividade da proteína recombinante

		Leite da fundadora transgênica Linhagem 01 (R0)	Leite da fundadora transgênica Linhagem 02 (R0)	Plasma Humano Normal	Plasma Hemofílico suplementado com FIX (Sigma)	Leite de fêmea não-transgênica
Western blot		+	+	+	+	-
Atividade de	(mU/ml)	17	31	44	7	0
Coagulação	s	76	69	37.6	87	141

**Tabela 1:** Atividade de coagulação do FIX recombinante no leite de camundongas transgênicas e não-transgênicas.

## **Publicação 1**

# **Production of a recombinant human factor IX in milk of mice**

Sharon F. C. Lissauskas<sup>1,2</sup>, Nicolau B. Cunha<sup>1</sup> • Giovanni R. Vianna<sup>1</sup> • Érica A. Mendes<sup>1</sup> • Gustavo L. Ramos<sup>1,2</sup> • Andréia Q. Maranhão<sup>2</sup> • Marcelo M. Brígido<sup>2</sup> • Jussara O. S. C. Almeida<sup>3</sup> • João B. Pesquero<sup>4</sup> • Francisco J. L. Aragão<sup>1</sup> • Elfbio L. Rech<sup>1</sup>

(1) Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final), Brasília, DF, CEP 70770-900, Brazil.

(2) Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil.

(3) Hospital de Apoio de Brasília, SGAIN, Quadra 04, Lote 04, Asa Norte, Brasília, DF, CEP 70.620-000, Brazil.

(4) Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Pro-Reitoria de Extensão – PROEX – Rua Pedro de Toledo, 957, Vila Clementino, São Paulo, SP, CEP 04023-062, Brazil.

### Production of a recombinant human factor IX in milk of mice

Sharon F. C. Lisauskas<sup>1,2</sup>, Nicolau B. Cunha<sup>1</sup> • Giovanni R. Vianna<sup>1</sup> • Érica A. Mendes<sup>1</sup> • Gustavo L. Ramos<sup>1,2</sup> • Andréia Q. Maranhão<sup>2</sup> • Marcelo M. Brígido<sup>2</sup> • Jussara O. S. C. Almeida<sup>3</sup> • João B. Pesquero<sup>4</sup> • Francisco J. L. Aragão<sup>1</sup> • Elíbio L. Rech<sup>1</sup>

(1) Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final), Brasília, DF, CEP 70770-900, Brazil.

(2) Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil.

(3) Hospital de Apoio de Brasília, SGAIN, Quadra 04, Lote 04, Asa Norte, Brasília, DF, CEP 70.620-000, Brazil.

(4) Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Pro-Reitoria de Extensão – PROEX – Rua Pedro de Toledo, 957, Vila Clementino, São Paulo, SP, CEP 04023-062, Brazil.

Corresponding author: Elíbio Rech

Email: [rech@cenargen.embrapa.br](mailto:rech@cenargen.embrapa.br)

Telephone: 61 – 3448-4642

#### Abstract

Human factor IX is synthesized in the liver and secreted in the blood, where it participates of reactions group involving coagulation factors and proteins that permit the sanguine coagulation. In this work two lines of transgenic mice were developed to express the *FIX* gene in the mammalian glands under control of the milk  $\beta$ -casein promoter. The founding females secreted the FIX in their milk (3% total soluble protein). The stable integration of transgene was confirmed by southern blot analysis. The presence of the FIX recombinant protein in the milk of transgenic female was confirmed by western blot and the coagulation activity was revealed in clotting assays which determines the thromboplastin time. The coagulation activity in human blood treated with recombinant FIX has increased while the time of coagulation decreased. Our results confirm the production of a large amount of recombinant biologically active FIX in the mammary gland of transgenic mice.

**Keywords** Transgenic mice, recombinant factor IX, animal as bioreactor, human factor IX

## Introduction

Hemophilia B or Christmas disease is a recessive X linked disease characterized by abnormal production of human coagulation factor IX. In Brazil exists an estimated incidence of 1 in 10,000 habitants, and 15% have hemophilia B. Human factor IX is a 55 kDa single chain vitamin K dependent plasma zymogen which have a serine protease function and plays a key role in both intrinsic and extrinsic coagulation pathway. The intrinsic pathway is a series of enzyme mediated cleavages by means of plasma factors peptide chains fragmentation. Upon activation of FIX to FIXa by FXIa, an 11 kDa activation peptide is removed from factor IX molecule by cleavage of two peptide bonds. These changes allow the activation of factor X and are crucial to protrombin and fibrinogen production and blood cloth (Roth et al. 2001).

Factor IX is synthesized in the liver parenchyma cells and requires a posttranslational vitamin K-dependent modification in order to work appropriately. Until today no recombinant biosynthesis system of human FIX has evolved to commercial production, despite its secretion reported in transgenic sheep milk (Clark et al., 1989).

Christmas disease treatment is the injection of this lack factor, through the source of human blood purified FIX injection from healthy donors plasma, which incurs in elevated costs and high prion and virus contamination risks. Besides, these factors are instable and requiring frequently injections. For this reason, in some countries the use of the genetic engineering products is significantly growing up. Today, Brazil is total dependent of the importation of human factor IX biomolecule from pooled plasma.

Transgenic animals are pointed as potential successful bioreactors for complex heterologous protein biosynthesis, such as FIX, since high yields of protein and structural quality are generally associated with those systems (Houdebine 1994; Wall 1996). Another advantage of alternative based production of recombinant drugs in transgenic mammals is the ability to provide post-translational modifications correctly, what allow folding assembles and glycosilation similar to those present in humans (Larrick and Thomas 2001). The mammary gland can be considered currently, the most efficient bioreactor (Colman 1996; Rudolph 1999). Extensive studies have demonstrated the possibility of the production of a great variety of recombinant proteins in milk, many of them, complexes proteins, as: human IGFI (Zinoveiva et al., 1998), hGH (Devinoy et al., 1994), human lysozime (Lee et al., 1998), human lactoferrine (Platenburg et al., 1994), human erythropoietin (Sohn et al., 1999), human paratireoide hormone (Rokkones et al., 1996), recombinant factor VIII in milk of transgenic rabbit (Chrenek et al., 2007). These examples demonstrate the capacity of the mammary gland to synthesize, to mature and to secrete active biologically recombinant proteins.

Transgenic mice lines are attractive by a series of advantages like the shortest reproduction cycle even when compared to other mammals, the fast female lactation, the high milk protein content and the relatively lower costs of maintenance the animals. Moreover, this model system will make possible the future applicability in large animals, as bovines and goats, used as efficiency bioreactors.

In the present work we report the expression of human coagulation factor IX in transgenic mice milk and the evaluation of independent line level expression and biological function of the recombinant molecule. For human *FIX* expression in transgenic mice, protein coding sequence was flanked by the  $\beta$ -casein promoter, a strong mammary gland tissue-specific regulatory sequence and microinjected in mice genome.

## Material and Methods

### Human factor IX expression vector

The code region of the *FIX* (coding for the human factor IX) gene (GeneBank accession number: XM010270) (Yoshitake et al., 1985) was amplified by PCR from a cDNA library ( $\lambda$  TriplEx, Clontech, USA) from human liver. The fragments were cloned into the pGEM-T Easy (Promega, USA) vector for PCR products. Primer pair BCproFIX (5'-CGCTCGAGATGGCAAAGGTCTCATCCTTGCTGCCTGGTGGCTCTGGCCCTTGCAACAGTTTTCCTTGATCATGAAA-3'; including the sites for *Xho*I [underlined] and the sequence of the secretion signal of the bovine beta-casein [in bold]) and FIXstop3C (5'-CCTTCTCGAGCCATCTTTCATTAAGTGAGC-3'; including the sites for *Xho*I [underlined]) was used to amplify a 1,378-bp fragment from the *FIX* gene. PCR reactions were carried out in a thermocycler (PTC-100; MJ Research, Watertown, MA, U.S.A.) in a 50- $\mu$ l solution containing 10 ng of DNA, 60 mM Tris-SO4

(pH 8.9), 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 250 nM each dNTP, 200 nM each primer, and 5 U of platinum Taq DNA polymerase high fidelity (Invitrogen, USA). The mixture was treated at 95°C (5 min) and subjected to 35 cycles of amplification (95°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 68°C for 1 min), with a final elongation cycle of 5 min at 68°C. PCR products were sequenced by using universal M13 and T7 primers on automatic sequencer (ABI Prism1 3700). The 1,378-bp fragment from the *FIX* gene was cloned into the *Xho*I restriction site of the pBC1 mamalian expression vector (Invitrogen, USA) to generate the vector pBC1FIX, which was used for pronuclear microinjection.

## DNA preparation for generation of transgenic mice

The plasmid pBC1FIX was digested with *Sal* I and *Not* I to eliminate the prokaryotic ampicillin sequence. The fragment containing the *FIX* sequence was separated by 0.8% agarose gel electrophoresis and purified from gel with QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, USA). The elution of DNA from de column was made with microinjection buffer (MIB - 8mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.15 mM EDTA). The concentration was adjusted to 3 ng/μl final concentration in MIB, and used for production of transgenic mice.

## Superovulation

B6CBAF1 female mice (4-5 week old) were superovulated by intraperitoneal (i.p.) injection of 5IU pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG – Sigma, USA). Approximately 48h after were administered 5IU human chorionic gonadotropin (hCG – Sigma, USA) also by i.p. injection, and coupled overnight with B6CBAF1 male mice.

## Collection of Zygotes

The pronuclear-stage embryos were collected 20h after the hCG injection. The cumulus cells were removed by placing the zygotes in M2 medium (Sigma, USA) complemented with hyaluronidase (0.1% w/v) (Sigma, USA) for 2 min. The embryos were washed several times in pure M2 medium to remove hyaluronidase and were maintained in M16 culture medium (Sigma, USA) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> until microinjection.

## Pronuclear microinjection

Approximately 3 pl of exogenous DNA solution was injected into one of the pronuclei with the aid of a pair of manipulators at a magnification 400x, in an inverted microscope with Normarski differential interference contrast optics. The injection took place in a small drop of M2 medium covered by mineral oil (Sigma, USA) as previously reported (Chrenek et al., 2007). After that, the survived embryos returned to M16 medium into the CO<sub>2</sub> incubator.

## Embryo Transfer

Microinjected embryos (15 to 30 zygotes per foster mother) were transferred into the oviduct of pseudopregnant females (Swiss) on the day of microinjection. The pseudopregnancy of females was induced by mating with vasectomized male (Swiss) (Chrenek et al., 2007).

## PCR analysis

Genomic DNA was purified using the commercial kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega, USA), and used as template in the reactions containing specific primers that pared with the internal sequence of the *human factor IX* gene. Primers sequences FIXAL256: 5' - GATGGAGATCAGTGTGAGTC-3' and FIXAL 751c: 5' - TAACGATAGAGCCTCCACAG-3' were utilized to amplify a 495 bp sequence. DNA was subjected to 35 cycles of amplification (94 °C/2 min, 94°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min and 72°C/7 min) carried out in 25 μl aliquots containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 160 μM of each dNTP; 2,0 μM of each primer; and 2 U of *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) and ca. 20 ng of genomic DNA.



## Recovery and Protein Purification

Milk samples were taken from lactating transgenic and non-transgenic mice females on the day 7 of first lactation. In order to stimulate milk down, intramuscular injection of 5IU of oxytocin (Sigma, USA) was applied 30 min before milk collection. The samples were either subjected to further analysis or stored at -80°C until used.

Recombinant protein purification from the milk of the transgenic and non-transgenic animals was carried out by centrifugation (5,000g for 20 minutes at 4°C) and the upper lipid layer was removed.

## Southern blot analysis

Genomic DNA (15 µg) isolated using the commercial kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA) was digested with *Kpn* I enzyme (100 units), separated on a 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>). The hybridization was carried out using the PCR-generated 510 bp *FIX* probe, labelled with α[<sup>32</sup>P]-dCTP (110 TBq/mol) using a random primer DNA labelling kit (Pharmacia Biotech, USA) according to the manufacturer's instructions.

## Western blot analysis

Total protein (60 µg) was extract from transgenic mice milk and 350 ng of human factor IX (Sigma, USA) were resolved in a 12% SDS-PAGE mini gel, electrotransferred to Hybond N<sup>+</sup> nitrocellulose membrane (Hybond) under 100mA for 50 min, followed by 4°C overnight blocking in Tristy buffered saline solution (20mM Tris base, 137mM NaCl, pH 7.6) containing 5% dry milk and 0.1% tween 20.

The membrane was incubated with rabbit igG policlonal anti-human factor IX diluted 1: 2,500 in blocking buffer, during four hours at 25°C. Secondary antibody incubation was performed by three hours at 25°C with goat anti-rabbit igG conjugated with Alkaline Phosphatase (Bio-Rad) in a dilution of 1: 5,000 in blocking buffer. Alkaline Phosphatase activity was monitored by 10 ml detection buffer consisting of 100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 66µl NBT 50mg/ml (Nitro blue tetrazolium) and 33µl BCIP 25mg/ml (5-bromo-4chloro-3-indolil phosphate). Reaction was stopped by Tris EDTA 20mM and the colored product was detected.

## Bioactivity assay

The functional activity of FIX in mice milk samples was determined by assaying its ability to restore clotting activity using FIX-depleted human plasma together with the respective lack factor. The partial thromboplastin time was interpreted using a reference curve obtained with dilutions of standard human plasma or a normal plasma pool mixed with the deficient plasma.

The samples (transgenic mice milk and not transgenic mice milk) were diluted to 160 pg/µl of factor IX. 100 µl of each diluted milk sample was added in 100 µl of factor IX deficient plasma plus 100 µl of activated cephalin. After 5 minutes of incubation at 37°C, 100 µl of calcium chloride 0,025M was added, and the coagulation time determined.

## Results

### Transgenic mice

F<sub>2</sub>-hybrid zygotes produced by mating male and female F<sub>1</sub>-hybrids (B6CBAF1) were microinjected with pBC1FIX vector (Fig. 1) and yielded thirty-four litters. PCR and southern blot analysis revealed two transgenic founders. The transgenic male founder was responsible for the continuity of line 1, and the transgenic female founder for line 2. In order to generate the progeny of these transgenic animals, the male and the female founders were mated with wild type animals of the C57bl/6 strain. As a result, 13 animals

were generated on the F<sub>1</sub> generation, 9 animals from line 1, and 4 from line 2. F<sub>1</sub> progeny was submitted to PCR analysis, and the positive females were mated with male wild type mice for the attainment of the F<sub>2</sub> generation. Seven days after birth of the F<sub>2</sub> generation, the milk of the founders and F<sub>1</sub> female mothers was collected in order to analyze the FIX recombinant protein expressed in their milk.

PCR analysis (Fig. 2) revealed the presence of a 495-bp fragment from the factor IX transgene coding in both mice founders and progenies. Southern blot analysis confirmed the integration of the FIX transgene (Fig. 2). DNA isolated from a non-transgenic line did not hybridize with the FIX cassette probe.

#### Western blot analysis

In milk samples obtained at day 7 from two lactating females from distinct lines, a band corresponding to 50 kDa was detected by western blot analysis. This signal was not detected in non-transgenic milk (Fig. 3).

#### Functional activity of FIX in mice milk

Bioactivity assay was performed in order to detect the activity of FIX recombinant protein in percentage rate of its clotting action. It was found that a high level of concentrate active protein was encountered per microliter in mice milk. Milk of transgenic founder line 1 (F<sub>0</sub>), milk of transgenic founder line 2 (F<sub>0</sub>), normal human serum, hemophilic serum supplemented with FIX (Sigma, USA) and milk of non-transgenic female were estimated. The coagulation activity detected by mU/ml was 17, 31, 44, 7 and 0, and the time of coagulation was confirmed in 76, 69, 37.6, 87 and 141 seconds, respectively (Table 1).

## Discussion

Transgenic animals are capable to produce biological active recombinant proteins in high levels. With the use of the expression vector pBC1, specific for the genetic transformation of mammal cells, the recombinant proteins are secreted in high levels in the transgenic animal's milk. Based on this, our constructed expression vector is an integrative vector that confers stable integration at host genome and expression of recombinant protein in the milk of transgenic animals detected by southern blot, western blot and bioactivity analysis.

We used the microinjection method to produce transgenic mice. It is the most efficient technology used in generation of transgenic mice for gene addition (Watanabe et al., 2007) compared with other systems (Huszar et al., 1985; Jahner et al., 1985; Lavitrano et al., 1989). Our transgene integration efficiency was 6% considering the presence of two founders in 34 litters born. However, this technique has proven to be far less efficiency in farm animals (Wall 2001). Since this technique result in insertional randomly transgenes, transgenic mice were screened by PCR and confirmed by Southern blot analysis in order to evaluate the presence of transgene introduced in the founders as well as in the progenies. We have studied transgenic integration in bovine cells (Lisauskas et al., 2007) to carry out gene-target integration to produce desired recombinant protein expression levels in opposition to randomly integration and variable expression.

Our results showed that the amount of recombinant polypeptide secreted by mammary gland cells of founder 2 reached up to 2% of total soluble milk protein content, what indicates a satisfactory expression level modulated by the beta-casein promoter. Korhonen et al. (1997) generated several transgenic mouse lines and rabbits expressing efficiently (up to 0.3 mg/ml in mice and up to 0.5 mg/ml in rabbits) human erythropoietin in their milk with bovine beta-lactoglobulin as promoter.

Western blot results suggests the maintenance of the correct molecular mass of secreted FIX presented in both founders and F<sub>1</sub> females milk and the efficiency secretion strategy provided by the beta-casein secretion signal. Three band pattern presented by SIGMA's purified FIX and recombinant FIX probably reflects the activation of FIX into FIXa by two peptide bonds cleavage of 55 kDa single chain (upper band), releasing FIX 44 kDa heavier chain (intermediate band) and 11kDa light chain (lower band). Vitamin K — an important coagulation effector- high concentration in mice milk corroborates the hypothesis of correct activation of FIX zimogen correlated to western blot band pattern and further comprovation by coagulation bioassay.

In our study, to comprove the efficiency of the FIX recombinant protein activity, bioassays were performed with purified recombinant protein from transgenic mice milk. It was observed activity of the

recombinant coagulation factor IX protein in its coagulant action, demonstrating that the protein function is not lost when produced in heterologous systems. Milk of transgenic founder line 1, transgenic founder line 2, Normal human serum, hemophilic serum and milk of non-transgenic female were compared. It was detected the activity of the protein in percentage rate of its clotting action. It was found that a high level of concentrate active protein was encountered per  $\mu\text{l}$  in mice milk.

Transgenic technology is especially attractive for the recombinant protein production necessary on a large scale, due to units of required dosages, multiple administration, application in the population on a large scale, or necessity of industrial production. The annual market of large scale recombinant proteins, the plasma factor VIII and IX, is approximately 5-10 Kg. In accordance with World Federation of Hemophilia (Montreal, Canada), current need of factor IX is approximately US\$190 millions in the United States. Factor VIII is approximately US\$ 2 billion. The potential market for the mentioned products has been limited for the plasma supplement.

The final stage of the process that consists of the purification of recombinant proteins from the milk generally does not present particular difficulties. The possible biological contaminants prions are the ones that can present problems. However, evidences from World Health Organization emphasizing that prions have not been detected in association with milk and semen, when closed herds are prioritized (Ziomek 1996; Rudolph 1995; Gavin 2001), discarding any suspicion of possible biological contaminants in recombinant proteins secreted in the milk of transgenic animals.

**Acknowledgements** The authors are grateful to Tatiana Lozada Medeiros and Ana Luisa Santa Cruz de Almeida, for technical assistance. This study was supported in part by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Hospital de Apoio de Brasília were the protein in its clotting action was performed, CNPq and International Hemophilia Training Center - World Federation of Hemophilia. S.F.C.L. was supported by a fellowship from CNPq.

## References

- Chrenek P, Ryban L, Vetr H, Makarevich AV, Uhrin P, Paleyanda RK, Binder BR (2007) Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits. *Transgenic Res* 16:353-361
- Clark AJ, Archibald AL, Bessos H, Harris S, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw (1989) The Molecular manipulation of milk composition. *Genome* 31: 950-955
- Colman A (1996) Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. *Am J Nutr* 63:639-645
- Devinoy E, Thérot D, Stinnakre MG, Fontaine ML, Grabowski H, Puissant C (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res* 3:79-89
- Gavin WG (2001) The future of transgenics. *Regulatory Affairs Focus* 13-18
- Houdebine LM (1994) Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *J Biotechnol* 34:269-287
- Huszar D, Balling R, Kothary R, Magli MC, Hozumi N, Rossant J, Bernstein A (1985) Insertion of a bacterial gene into the mouse germ line using an infectious retrovirus vector. *Proc Natl Acad Sci* 82:8587-8591
- Jahner D, Haase K, Mulligan R, Jaenisch R (1985) Insertion of the bacterial gpt gene into the germ line of mice by retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci* 82:6927-6931
- Larrick JW & Thomas DW (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57:717-723
- Lee WK, Kim SJ, Lee T, Han Y, Yoo OJ, Im KS, Lee K (1998) Expression of a bovine beta-casein/human lysozyme fusion gene in the mammary gland of transgenic mice. *J Biochem Mol Biol* 31:413-417
- Lisaukas SFC, Rech EL, Aragão FJL (2007) Characterization of transgene integration loci in transformed Madin Darby bovine kidney cells. *Cloning and Stem Cells* 9:456-460
- Platenburg GJ, Kootwijk EP, Kooiman PM, Woloshuk SL, Nuijens JH, Krimperfort PJ (1994) Expression of human lactoferrin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 3:99-108

- Rokkones E, Fromm SHO, Kareem BN, Klungland H, Olstad OK, Hogset A (1996) Human parathyroid hormone as a secretory peptide in milk of transgenic mice. *J Cell Biochem* 59:168-176
- Roth DA, Kessler CM, Pasi KJ, Rup B, Courter SG, Tubridy KL (2001) The Recombinant Factor IX Study Group Human recombinant factor IX: safety and efficacy studies in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrates. *Blood* 98:13
- Rudolph NS (1995) Regulatory issues relating to protein production in transgenic animal milk. *Gen Engine News* 15:16-18
- Rudolph NS (1999) Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol* 17:367-374
- Sohn BH, Kim SJ, Park H, Lee SC, Hong HJ (1999) Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biol* 18:845-852
- Veli-Pekka Korhonen, Minna Tolvanen, Juha-Matti Hyttinen, Mikko Uusi-Oukari, Riitta Sinervirta, Leena Alhonen, Matti Jauhiainen, Olli A. Jänne, Juhani Jänne (1997) Expression of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin/Human Erythropoietin Fusion Protein in the Milk of Transgenic Mice and Rabbits. *European Journal of Biochemistry* 245 (2): 482–489
- Wall RJ (1996) Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45:57-68
- Wall RJ (2001) Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* 3:209-220
- Watanabe M, Umeyama K, Kawano H, Izuno N, Nagashima H, Miki K (2007) The production of a diabetic mouse using constructs encoding porcine insulin promoter-driven mutant human hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ . *J Reprod Dev* 53:189-200
- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K (1985) Nucleotide sequence of the gene for Human Factor IX (Antihemophilic Factor B). *Biochemistry* 24:3736-3750
- Zinoveiva N, Lassing C, Schams D, Besenfelder U, Wolf E, Muller S (1998) Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations. *Transgenic Res* 7:437-447

**Figure 1** (A). PCR screening in mice. 1, 2, 3, 4 correspond to transgenic mice; 5 non-transgenic mice; 6 internal negative control; 7 *FIX* sequence corresponding to 495 bp. (B). Southern blot analysis of transgenic animals lines 1 and 2 (1, 2, 3, 4, 5 and 6) and non-transgenic mice genomic DNA (7).

**Figure 2** Western blot of transgenic female milk samples for *human FIX* gene. 1 correspond to 350 ng purified FIX protein (Sigma, USA); 2 correspond to 100  $\mu$ g total milk protein of non-transgenic female; 3 and 4 to 100  $\mu$ g of transgenic founders lines 1 and 2; 5 and 6 to 100  $\mu$ g of F<sub>1</sub> progeny from line 1; 7 and 8 to 100  $\mu$ g of F<sub>1</sub> progeny from line 2.

**Table 1** *FIX* recombinant coagulation activities in the milk of transgenic and non-transgenic mice

Samples	Method		
	Western blot	Coagulation activity (mU/ml)	Thromboplastin time (s)
Milk of transgenic founder line 1 (F <sub>0</sub> )	+	17	76
Milk of transgenic founder line 2 (F <sub>0</sub> )	+	31	69
Normal human serum	+	44	37.6
Hemophilic serum supplemented with FIX (Sigma, USA)	+	7	87
Milk of non-transgenic female	-	0	141

## CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE INTEGRAÇÃO DE TRANSGENES EM GENOMA BOVINO

### INTRODUÇÃO

DNAs exógenos podem ser inseridos em genomas por meio de integração retroviral, transposons, e por técnicas não-virais de transferência de genes, como por exemplo, ensaios de transfecção. Os locais de tais inserções são usualmente identificados por preparação de bibliotecas genômicas e isolamento de linhagens clones contendo o DNA exógeno e as seqüências flanqueadoras. Neste projeto, linhagens celulares bovinas transgênicas foram utilizadas como modelo de estudos da integração dos transgenes. Várias linhagens celulares clones de MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) transfectadas foram expandidas a partir de uma única célula isolada e colocada em cultivo celular até a expansão em torno de 36 µg de DNA. As linhagens celulares preestabelecidas foram plaqueadas numa concentração de  $3 \times 10^5$  células/ml em uma placa de 24 poços e transfectadas com o vetor plasmidial pCIneo-β, previamente construído no laboratório, compreendendo os genes *neo* (antibiótico neomicina) e *β-gal* (β-galactosidase) sob controle do promotor constitutivo CMV (citomegalovírus). A transfecção realizou-se utilizando o reagente Lipofectamina™ (Invitrogen, USA), segundo Oliveira et al., 2005. Vinte dias após a transfecção e seleção em meio suplementado com antibiótico geneticina (G418: 400 µg/ml), as células transgênicas foram isoladas e expandidas em cultura. O DNA genômico das

linhagens clones foram resgatados e as seqüências flanqueadoras foram identificadas pela técnica de resgate de plasmídio em *Escherichia coli*.

Uma vez que a integração de DNAs exógenos pela técnica de transfecção dá-se aleatoriamente, o método baseado na técnica de IPCR (PCR invertido) para amplificar a região flanqueadora do DNA cromossomal no local de inserção do transgene é um método simples e útil para este propósito. A utilização desta técnica por meio de importantes estudos deve contribuir para novos conhecimentos na construção de vetores bovinos com genes-alvo.

Genes-alvo é um método mais poderoso e eficiente de manipulação genética e requer basicamente os mesmos procedimentos de transfecção, seleção e cultivo celular. O objeto de alcance para inúmeros benefícios biomédicos, como por exemplo, a ablação de antígenos de transplantes xenorreativos, inativação de genes responsáveis por doenças neuropatogênicas e a inserção precisa de transgenes determinados para produzir proteínas de terapia humana, têm incentivado setores tanto comerciais quanto medicinais para o investimento nesta nova tecnologia, cuja proposta baseia-se no local de integração apropriado de uma maneira mais exata e conseqüentemente mais eficiente a fim de produzir determinadas variantes em quantidades desejáveis.

## **Vetores de expressão**

O ponto chave da tecnologia de transgênese se resume na introdução de determinada informação genética com nova funcionalidade no genoma hospedeiro. A estratégia para a construção de um “transgene” envolve a seleção de um elemento regulatório gênico (geralmente denominado promotor, mas usualmente contendo um elemento “enhancer” (acentuador) além de um promotor) que tem como função determinar o tecido no qual o gene será expresso, bem como o tempo e a magnitude de expressão. Em alguns casos, o elemento regulatório pode agir como um “interruptor”, permitindo ao transgene ser “ligado” (ativado) ou “desligado” (inativado). A segunda parte da construção gênica consiste na seqüência de DNA que codifica a proteína desejada (geralmente referida como o componente estrutural de um transgene). A finalização do transgene se restringe ao elemento regulatório denominado “terminador” que tem a função de “avisar” o término da transcrição do transgene em questão. A maioria dos terminadores consistem numa seqüência rica de A (nucleotídeo Adenina), denominada de cauda poly(A), responsável pela “sinalização” ao mecanismo de transcrição de que aquela seqüência é o término do transgene.

## **Cultivo de células animais**

A cultura de tecidos surgiu no começo do século vinte (Harrison, 1907; Carrel, 1912) como um método para se estudar o comportamento das células animais desprovidas de variações sistêmicas ocorridas no organismo animal.



Essas células oscilam em número e em tamanho tanto durante a homeostase, quanto sob condições de *stress*. A técnica foi elaborada primeiramente pela desagregação de fragmentos de tecidos, sendo que o crescimento das células limitava-se à sua migração, a partir do fragmento do tecido dissociado. A cultura de um tecido pode ter como origem a dissociação do material biológico, tratado de diferentes formas (enzimático, mecânico ou químico), sendo que as células dispersas desse tecido tratado podem então ser cultivadas *in vitro* para subseqüentes estudos.

A tecnologia de cultura de tecidos tem sido adotada aplicavelmente dentro de muitas rotinas na medicina e na indústria. Análises cromossomais de células, retiradas do útero pela técnica de amniocentese, não só podem revelar distúrbios genéticos do feto que ainda nem nasceu e infecções virais podem ser analisadas qualitativamente e quantitativamente por meio de monocamadas de cultura de células hospedeiras, efeitos tóxicos de certos componentes farmacêuticos, além de análises de potenciais poluentes do meio ambiente que podem ser detectados e mensurados por meio de ensaios de formação de colônias (Freshney, 1992).

Ao se começar uma cultura de tecidos, alguns parâmetros devem ser ajustados, como o controle físico-químico do meio ambiente das células: pH, temperatura, pressão osmótica, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc., mantendo uma condição fisiológica relativamente constante e controlada. A maioria dos meios de cultura utilizados ainda requer suplementação com soro, cuja concentração é variável dependendo do tecido em questão (Honn *et al.*, 1975). E podem conter ainda elementos indefinidos, tais como certos hormônios e outras substâncias

regulatórias. Gradualmente, as funções do soro são estudadas e como resultado estão substituindo-o cada vez mais por constituintes definidos (Olmsted, 1967).

O tipo celular eleito para ser cultivado deve estar baseado nos fins de utilização da cultura, ou seja, as células estarão destinadas para: transformação genética, linhagem celulares permanentes, doadoras de núcleo para transferência nuclear, monocamada para co-cultivo etc. Além disso, o laboratório deve dispor, no mínimo, de equipamentos necessários e condições de assepsia, antes de se iniciar uma cultura de tecidos.

No presente trabalho foram cultivadas linhagens celulares somáticas de bovinos *in vitro*. As células MDBK são consideradas imortalizadas, ou seja, as células são senescentes, mesmo quando cultivadas *in vitro*, podendo ser submetidas a mais de 300 repiques (Lisauskas et al., 2007). Essas células são aderentes, de fácil manutenção e crescimento rápido, compatíveis com longos períodos de cultura e intervenções ao longo das análises de monitoramento requeridas.

### **Modificação genética de células de mamíferos**

Várias tecnologias para a introdução e expressão das construções gênicas em diferentes animais vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas. Sistemas acurados de transporte de poucas quantidades de DNA se restringem (1) à microinjeção de DNA dentro do pronúcleo masculino de ovócitos fertilizados, sendo utilizada para produção de camundongos transgênicos (Lisauskas et al., 2008), coelhos (Rosochacki *et al.*, 2002), ovinos (Simons *et al.*, 1988; Hammer *et al.*, 1985), suínos (Hammer *et al.*, 1985) e bovinos (Wall *et al.*, 1985; Wall *et al.*,

1988; Krimpenfort *et al.*, 1991; Wall *et al.*, 1996), mesmo com apenas uma pequena proporção (~5%) dos animais contendo o transgene integrado em seu genoma (Eyestone, 1994; Damak *et al.*, 1996); (2) à utilização de células espermáticas como fontes carreadoras de DNA exógeno (Gandolfi *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 1999; Lauria & Gandolfi, 1993; Lavitrano *et al.*, 1989; Brackett *et al.*, 1971); e (3) a vetores baseados em transposons (Belur *et al.*, 2003). Por outro lado, sistemas que transportam grandes quantidades de DNA envolvem o uso de vetores retrovirais (Chan *et al.*, 1998; Haskell & Bowen, 1995; Huszar *et al.*, 1985; Jahner *et al.*, 1985; van der Putten *et al.*, 1985), por sua eficiência de penetração celular e integração estável do transgene no genoma hospedeiro. Uma vez que retrovírus conseguem apenas infectar células em divisão celular, podendo causar efeitos deletérios nas células, como resultado de mutagêneses insercionais quando da integração do provírus no genoma (Onions *et al.*, 1993), sistemas mais eficientes de transporte de DNA, chamados de vetores adenovirais, que conseguem infectar células que não estão em divisão celular, podem também ser utilizados, apesar de não conseguirem se integrar no genoma hospedeiro (Channon *et al.*, 1996; Tsukui *et al.*, 1996; Feldman & Isner, 1995). Outros sistemas de vetores virais, chamados vetores episomais, utilizam o genoma viral de um papilomavírus tipo1 de bovino e se mantém como elemento genético extracromossomal estável de auto-replicação (DiMaio *et al.*, 1982; Ohe *et al.*, 1995; Sarver *et al.*, 1981; Mannik *et al.*, 2003).

Atualmente o método mais seguro e mais simples requerido para transfectar células de mamíferos é a lipotransfecção, utilizando lipossomos catiônicos (Cibelli, 1998; Keefer, 2001; Oliveira *et al.*, 2005). O mecanismo de transfecção mediado por lipossomo aparece como resultado da associação entre

os lipídios catiônicos e o DNA que fornecem uma rede de cargas positivas ao redor do vetor, permitindo a ligação com a rede de cargas negativas da superfície celular (Felgner *et al.*, 1989). Lipossomos são translocados para dentro da célula por fusão com a membrana plasmática ou por fagocitose (Wrobel & Collins, 1995; Friend *et al.*, 1996), e algumas partículas podem entrar no núcleo por fusão com o envelope nuclear (Wrobel & Collins, 1995; Friend *et al.*, 1996; Thierry *et al.*, 1997). Com isso, animais clones bovinos podem ser produzidos a partir de linhagens caracterizadas de células geneticamente modificadas, como fontes doadoras de núcleos transformados e microinjetadas em ovócitos previamente enucleados (Campbell *et al.*, 1996; Schnieke *et al.*, 1997; Iguma *et al.*, 2005).

### **Lócus de integração**

Devido à aleatoriedade da integração do transgene no genoma bovino pela técnica de lipotransfecção, apenas um pequeno número de eventos irá gerar animais transgênicos, expressando a proteína de interesse em níveis desejados (Schnieke *et al.*, 1997). A fim de aprimorar o método de lipotransfecção, alguns autores têm estudado o lócus de integração do vetor plasmidial no genoma hospedeiro (Shi-Wu Li *et al.*, 1996, Lisauskas *et al.*, 2007), bem como a caracterização desses locais. A abordagem baseia-se na técnica de resgate do plasmídeo em *Escherichia coli* e permite a retirada do vetor de expressão do genoma em estudo, e a caracterização das regiões flaqueadoras do DNA hospedeiro, a fim de isolar as regiões de integração dos transgenes (Mannik *et al.*, 2003).

A vantagem, em se estudar o locus de integração do transgene possibilita a seleção e geração de eventos elites que expressem o transgene em níveis mais altos e desejáveis, além da utilização de linhagens aptas à transferência nuclear para a geração de bovinos transgênicos. O sucesso reportado por McCreath *et al.* (2000) baseia-se em estratégias desenvolvidas para a aplicação da técnica na geração de vetores bovinos com genes-alvo (“gene targeting”).

Neste trabalho, parâmetros preestabelecidos de lipotransfecção para células somáticas bovinas (Oliveira *et al.*, 2005; Oleskovicz *et al.*, 2004) foram utilizados como protocolo base e aplicados em linhagens celulares bovinas MDBK (Lisauskas *et al.*, 2007), a fim de se estudar os locais de integração dos transgenes para servirem como modelo de transformação genética de células aptas a serem doadoras de núcleos transgênicos para a transferência nuclear.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local do Experimento**

Os experimentos desenvolveram-se nos Laboratórios de Transferência de Genes – LTG e de Micromanipulação - LRA, do Prédio de Biotecnologia – PBI, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – EMBRAPA/CENARGEN.

### **Preparação do DNA**

A construção do vetor de expressão foi efetuada de acordo com procedimentos padrões da tecnologia do DNA recombinante (Sambrook et al., 1989). O sistema de transformação das células somáticas MDBK utilizado foi padronizado segundo Oliveira et al. (2005).

As células MDBK foram transfectadas com o vetor de expressão denominado pCIneoBeta, construído no nosso laboratório, que contém o gene da beta-galactosidase sob controle do promotor constitutivo CMV e o gene *neo* (seqüência codante da neomicina fosfotransferase) sob controle do promotor constitutivo SV40. Este vetor foi construído introduzindo o gene da beta-galactosidase, após a excisão de sua seqüência codante de seu vetor comercial de origem pCMV- $\beta$  (7.2 kb) (Clontech, Palo Alto, CA, USA), com a enzima de restrição *NotI* e introduzida no sítio de clonagem do vetor comercial pCI-neo (5,472 pb).

O plasmídio foi amplificado em linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  e purificado segundo Kit de Purificação de Plasmídios Giga da Quiagen (Quiagen, Valencia, CA, USA). A concentração do DNA plasmidial após a purificação em coluna Quiagen foi mensurada por absorvância sob Ultra Violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A pureza do plasmídio foi assegurada segundo corrida em gel de agarose a 1% e mensuração da relação A260/A280 em espectrofotômetro. O vetor foi seqüenciado e apto para a transformação das células.

### **Cultivo celular e lipofecção da linhagem MDBK**

Linhagens celulares bovinas MDBK foram cultivadas em garrafas de cultura celular (35 cm<sup>2</sup>), em meio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM L-glutamina, 100  $\mu$ g/ml penicilina e 100  $\mu$ g/ml estreptomicina à 39°C em 5 % CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 93% N<sub>2</sub> em atmosfera úmida; sendo a substituição de meio realizada todas as segundas, quartas e sextas-feiras. As células utilizadas nos experimentos partiram da quinta passagem de cultivo, sendo que as passagens foram realizadas quando a confluência celular atingia em torno de 80%. As células eram removidas da placa de cultura com tratamento de 0,05 % de tripsina-EDTA (1ml/garrafa) por 10 minutos à 39°C. O total das células era centrifugado, ressuspenso e colocado novamente em garrafas de cultivo.

As MDBKs foram plaqueadas numa concentração de 3 $\times$ 10<sup>5</sup> céls/ml (80-90% de confluência) em placa de 24 poços e transfectadas no dia seguinte,

utilizando o lipossomo lipofectAMINA<sup>®</sup> Plus (Gibco, BRL Life Technologies), de acordo com Oliveira et al., 2005.

Para cada poço, 0,5 µg DNA (pCIneo-beta) foi diluído em 25 µl D-MEM sem soro fetal bovino (SFB), 4 µl de Reagente Plus e 1 µl lipofectAMINA<sup>®</sup>. A solução foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. O meio de cultivo (RPMI 1640 com SFB) da placa que continha as células foi retirado e a solução (sem SFB) adicionada às células. Após as 5 horas de incubação, a solução foi substituída por meio de cultivo RPMI 1640 com SFB.

### **Seleção das linhagens MDBKs transgênicas e isolamento de colônias clones**

48 horas após a transfecção, o meio de cultivo RPMI 1640 com SFB foi substituído por meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com SFB e com antibiótico geneticina (G418: 400 µg/ml). Após 20 dias em cultivo seletivo, uma única célula MDBK foi isolada em placa de ELISA (96 poços) para cultivo de linhagem clone transfectada, sob 100 µl de meio RPMI 1640 com geneticina. Neste caso, a substituição por meio novo era realizada semanalmente. Quando a cultura atingia a confluência do poço da placa de ELISA, por volta de 15 dias de cultivo, as células eram tripsinizadas e passadas para um poço de uma placa de 24 poços. Permaneciam em cultivo até sua confluência, cerca de 10 dias, e então eram passadas para uma garrafa de cultura. Todo processo de seleção foi realizado em meio com antibiótico. As colônias foram expandidas até a totalidade de 6 garrafas de cultura confluentes, sendo que cinco garrafas eram



utilizadas para o isolamento do DNA genômico (~36 µg) e uma garrafa era reservada para a congelação das células para a formação de um banco de germoplasma.

### **Deteccção da atividade de $\beta$ -galactosidase**

45 dias pós-transfecção, ou seja, antes de começar a expandir as culturas nas garrafas, foram feitos ensaios para a deteção da expressão de  $\beta$ -galactosidase nas células transfectadas, como segurança em expandir apenas as colónias transgênicas. As células que expressaram  $\beta$ -galactosidase foram visualizadas por ensaio com B-bromo-4-chloro-3-ingylo- $\beta$ -galactopyranoside (X-gal). As células foram fixadas com glutaraldeído 50% (Sigma, USA) e com formaldeído 37% por 15 minutos e então incubadas com solução X-gal (0,2% X-gal, 2mmol/l  $MgCl_2$ , 5mmol/l  $K_4Fe(CN)_6$ , 5mmol/l  $K_3Fe(CN)_6$ ). O sucesso da transfecção das células foi demonstrado pela coloração azul das colónias clones na sua totalidade, após 48 horas de incubação.

## **Isolamento do DNA genômico**

As cinco garrafas de culturas confluentes destinadas ao isolamento de DNA foram tratadas com 0,05% de tripsina-EDTA (1 ml/garrafa) por 10 minutos à 39°C. O total de todas as garrafas foi centrifugado, ressuspendido em PBS (Tampão salina fosfatada) e lavado por mais três vezes com o intuito de retirar o máximo de resíduo do meio de cultivo. O DNA genômico foi isolado segundo McCreath *et al.* (2000), utilizando Kit de isolamento e purificação de DNA genômico (Wizard<sup>®</sup>).

## **Técnica de Resgate de Plasmídio em E. coli**

Dez microgramas de DNA genômico provenientes das linhagens transgênicas clones foram digeridos com enzima de restrição adequada (que contenha apenas um sítio de restrição dentro do plasmídio, de preferência dentro do gene em questão), neste caso enzima *EcoRI* (Invitrogen, USA), durante 3 horas a 37°C. Após a reação, o DNA foi precipitado pela a adição de 3 volumes de Acetato/Etanol, incubado por pelo menos 30 minutos a -20°C e centrifugado por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga refrigerada (14000 rpm). O DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspendido em 110 µl de água milliQ autoclavada. O DNA foi ligado com T4 DNA ligase (Invitrogen, USA) em 400 µl overnight. No dia seguinte, a ligação foi precipitada (mesmo protocolo descrito) em ressuspensão final de 10 µl de água. A ligação foi transformada em células

competentes XL1-Blue por eletroporação no sistema BIO RAD de acordo com as especificações do fabricante. O DNA plasmidial das colônias transformantes foi extraído com Kit Quiagen (“miniprep”) e posteriormente analisado por perfil de restrição.

### **Identificação dos transgenes e regiões flanqueadoras**

O DNA genômico das células MDBK foi extraído e purificado utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI). Análises de PCR foram conduzidas a fim de confirmar a inserção dos transgenes.

A seqüência dos nucleotídeos dos dois pares de primers utilizados foi: a) para o gene *Amp<sup>r</sup>*: AMP 7 (5'-CTTAATCAGTGAGGCACC-3') e AMP 850c (5'-TCAACATTTCCGTGTCGC-3') para amplificar 860 pb do gene *neo*; e b) para o gene *β-galactosidase*: ER1 $\beta$ -gal (5'-TACGGCCTGTATGTGGTGGATG-3') e ER2 $\beta$ -gal (5'-CCAGTGCAGGAGCTCGTTATCG-3') para amplificar 820 pb do gene *gal*. As condições dos ciclos foram: 96°C / 2minutos; 94°C / 30segundos; 56°C / 30segundos; 72°C / 45segundos; X 40 ciclos; + 72°C / 10minutos; 4°C / 24horas. Os produtos de PCR foram analisados por corrida em gel de agarose comprovando a integração dos genes *Amp<sup>r</sup>* e *β-gal*.

As regiões do genoma animal em que os transgenes foram integrados foram detectadas a partir do mesmo material proveniente da técnica de resgate de plasmídios, e seqüenciados no seqüenciador automático ABI Prism. As seqüências foram submetidas a análises computacionais utilizando o pacote de programas de biologia molecular GCG. Neste caso, os primers foram

desenhados baseados no local da enzima de restrição cujo DNA foi tratado inicialmente e em que provavelmente as regiões flanqueadoras do genoma animal aparecem. As seqüências dos primers são: pCINEOB 1013: (5'→3') CTCTCCACAGGTGTCCACTC e pCINEOB 1252c (5'→3') GTGTCCAGACCAATGCCTCC.

### **Análises da integração**

Análises moleculares e bioquímicas foram conduzidas durante as diferentes etapas do desenvolvimento do projeto, envolvendo ensaios histoquímicos (X-gal), PCR e IPCR. Os protocolos foram efetuados de acordo com as orientações dos fabricantes (Stratagene), tecnologia do DNA recombinante (Sambrook et al., 1989) e segundo Aragão *et al.* (1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, nós seqüenciamos a região flanqueadora da integração dos transgenes em 26 linhagens celulares independentes de células MDBK, produzidas por transfecção via lipossomos. Para os 26 clones resgatados, as seqüências foram em tamanho e qualidade suficientes para distinguir ambigüidade no local da inserção no genoma bovino entre as linhagens. Nenhuma correlação foi estabelecida entre o local da integração dos transgenes e o nível de expressão de beta-galactosidase proporcionado por este local.

Análises de PCR confirmaram a presença de ambos os transgenes, *β-gal* e *neo*, em todas as linhagens clones geradas. Resgates de plasmídios confirmaram a presença de parte do transgene integrado e parte do sítio de integração do genoma bovino (tamanhos variando de 250 a 930 pb) no lócus de integração. As seqüências foram comparadas por meio de pesquisas BLAST de DNA genômico feitas manualmente contra o banco de dados do GeneBank utilizando o servidor de web NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

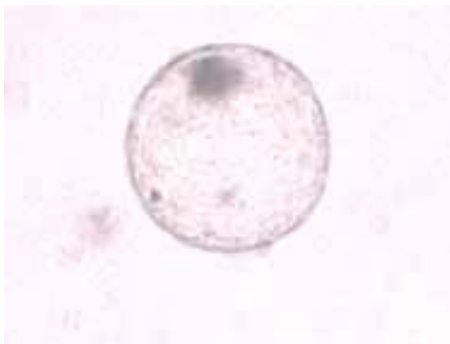
Os resultados revelaram que os transgenes foram integrados em 12 diferentes cromossomos, sugerindo que não há preferência cromossomal para a inserção do DNA exógeno. Resultados similares foram observados para *Arabidopsis*, em que as inserções foram encontradas em cinco cromossomos (Ríos et al., 2002). A presença da integração do vetor em regiões contíguas foi observada em dois clones B2 e D8. Duas seqüências (B2.4 e A1.5) não apresentaram similaridade com seqüência de bovinos disponibilizadas no GeneBank.

A maioria dos eventos de integração ocorreu dentro de regiões do genoma que são permissivas à transcrição, como observadas pela expressão dos genes da *beta-galactosidase* e o gene da *neomicina*. Entretanto, neste estudo todos os clones foram selecionados sob pressão de seleção positiva (400 µg/ml geneticina), a qual facilitou o isolamento de linhagens transfectadas cuja integração ocorreu em seqüências transcritas. Apesar de a maioria dos transgenes integrar em regiões da cromatina permissivas à transcrição, nós não estabelecemos uma conexão entre a integração e o nível de expressão do transgene proporcionado por estes locais.

Nós determinamos ambas as regiões flangeadoras da linhagem E4. Isto nos permitiu a comparação entre o locus da linhagem transfectada com o locus homólogo na linhagem selvagem. Foi observado que 11 nucleotídeos foram deletados na borda esquerda do sítio de integração do transgene. Este dado revela uma mutação insercional do gene *ed1*, o qual codifica para a proteína ectodisplasina A. A deleção parcial ou total desse gene causa a doença denominada displasia ectodérmica anidrótica em bovinos (Drogemuller et al., 2002). Além disso, outras mutações insercionais foram observadas: no clone CL2 (no gene *RPGR*, associado à degeneração progressiva da retina devido a uma retinite pigmentosa), no clone CL1 (no gene *myo10*, que codifica para a miosina X), e no clone C10.13 (no gene *bmp2*, que codifica para a proteína morfogenética 2 formadora de osso).

A identificação desses tipos de linhagens clones é importante para a prevenção de fenótipos indesejáveis para o nascimento de animais transgênicos ou para a geração de modelos apropriados para estudos de função gênica.

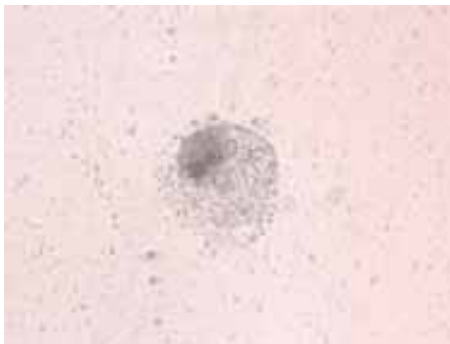
**CAPÍTULO 3: ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO  
EMBRIONÁRIAS BOVINAS.**



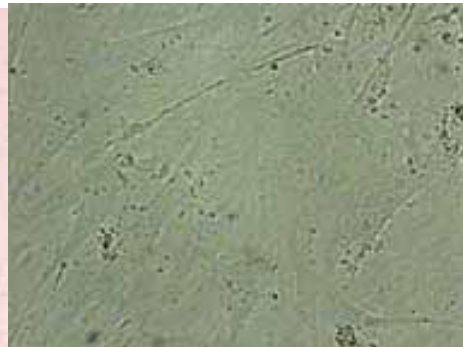
Embrão bovino produzido *in vitro*



Células-tronco embrionárias bovinas



Embrão pré-laser



Fedder's Monolayer



Human GFP single cell

Human GFP colony cell

## INTRODUÇÃO

O nome células-tronco foi originado da tradução do inglês de “stem-cell”. “Stem” significa caule, haste. O verbo “to stem” por sua vez, significa originar. As células-tronco têm essa denominação por terem a capacidade de regenerar células do sangue e de diversos tipos de tecidos que compõem o corpo humano. Por exemplo: células da pele só podem constituir a pele mas, as células-tronco podem constituir diferentes tecidos do organismo.

Todo organismo pluricelular é composto por diferentes tipos de células. Entre as cerca de 75 trilhões de células existentes em um homem adulto, por exemplo, são encontrados em torno de 200 tipos celulares distintos. Todos eles derivam de células precursoras, denominadas células-tronco (“stem cells”). O processo de diferenciação, que gera as células especializadas — da pele, dos ossos e cartilagens, do sangue, dos músculos, do sistema nervoso e dos outros órgãos e tecidos humanos — é regulado, em cada caso, pela expressão de genes específicos nas células-tronco, mas ainda não se sabe em detalhes como isso ocorre e que outros fatores estão envolvidos.

As células-tronco são células indiferenciadas, que podem se multiplicar e regenerar tecidos lesionados porque têm a capacidade de se transformar em células idênticas às dos tecidos em que foram implantadas. Por exemplo: se uma pessoa com infarto do miocárdio tem uma parte do coração afetada e as células dessa região morrem, as células-tronco podem se transformar em células cardíacas e substituir as células mortas, regenerando o tecido lesionado. Outra hipótese, no caso do diabetes, é de que as células-tronco, se inseridas no pâncreas, poderiam se diferenciar e começar a produzir insulina, o que traria a



cura para pessoas portadoras dessa doença.

As células-tronco estão presentes desde a vida embrionária até a vida adulta, e provavelmente até nossa morte. São elas as responsáveis pela formação do embrião e também pela manutenção dos tecidos na vida adulta. Elas estão presentes em: vários tecidos humanos (sangue, medula e outros tecidos), mas em quantidade muito pequena; no cordão umbilical e na placenta (em quantidades bem maiores); em embriões nas fases iniciais da divisão celular, isto é, na fase de blastocisto.

### **Classificação morfológica**

- Totipotentes: As células-tronco embrionárias que podem formar todos os tecidos incluindo a placenta são denominadas embrionárias - totipotentes. Elas constituem o primeiro grupo de até 32 células, e se formam nas primeiras 72 horas após a fecundação do óvulo. Neste momento, não é possível identificar neste grupo celular qualquer diferenciação de tecido específico. A formação da placenta e de seus anexos somente ocorre quando estas células totipotentes são implantadas no útero.

- Multipotentes: As células embrionárias, a partir do quinto ou sexto dia após a fecundação, quando constituem um grupo de 64 células, são capazes de formar qualquer espécie de tecido exceto placenta, e são denominadas células multipotentes.

- Oligopotentes: As células-tronco adultas que podem originar mais de um tipo de tecido são chamadas oligopotentes, e encontram-se, por exemplo, no tecido intestinal.

- Unipotentes: Em órgãos já formados, por exemplo, o sistema nervoso, são encontradas células-tronco tipo adulto que dão origem a um único tipo de tecido, a função provável destas células é a reparação de tecidos determinados. Já na medula óssea a função das células-tronco tipo adulto é manter o nível de elementos figurados do sangue que necessitam constante substituição.

### **Clonagem Terapêutica** (Yanagimachi R, 2002)

Esse processo consiste em obter um embrião da pessoa doente por meio da técnica de clonagem e retirar as suas células-tronco. Essas células têm potencial para se transformar em qualquer tipo de célula adulta do corpo, como, por exemplo, células cardíacas ou nervosas. Assim, elas poderiam ser estimuladas a se transformar no mesmo tipo de célula que estão lesadas no organismo do doente. Por exemplo: uma pessoa com leucemia que necessitasse de um transplante de medula seria clonada, dando origem a um embrião, do qual seriam retiradas as células-tronco. Dessa forma, a pessoa seria doadora para si mesma, sem correr o risco de que seu organismo viesse a rejeitar o transplante, pois as células utilizadas seriam retiradas de seu clone, que apresentaria a mesma constituição genética que ela.

A utilização das células-tronco para fins terapêuticos pode representar talvez a única esperança para o tratamento de inúmeras doenças ou para

pacientes que sofreram lesões incapacitantes da medula espinhal que impedem seus movimentos

Em 1997 foi anunciado o primeiro mamífero gerado a partir de células somáticas de um indivíduo adulto por meio da transferência nuclear, a ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997). Dolly só nasceu depois de 276 tentativas que fracassaram. Além disso, dentre as 277 células "da mãe de Dolly" que foram inseridas em um óvulo sem núcleo, 90% não alcançaram nem o estágio de blastocisto. A tentativa posterior de clonar outros mamíferos tais como camundongos, porcos, bezerros, um cavalo e um veado, também tem mostrado uma eficiência muito baixa e uma proporção muito grande de abortos e embriões malformados. É interessante que dentre todos os mamíferos que já foram clonados, a eficiência é um pouco maior em bezerros (cerca de 10% a 15%). Penta, a primeira bezerra brasileira clonada a partir de uma célula somática adulta, em 2002, morreu com pouco mais de um mês. Ainda em 2002, foi anunciada a clonagem do copy cat, o primeiro gato de estimação clonado a partir de uma célula somática adulta. Para isto foram utilizados 188 óvulos que geraram 87 embriões e apenas um animal vivo. Na realidade, experiências recentes com diferentes modelos animais têm mostrado que essa reprogramação dos genes, para o estágio embrionário, o processo que originou Dolly, é extremamente difícil.

O grupo liderado por Ian Wilmut, o cientista escocês que se tornou famoso por essa experiência, afirma que praticamente todos os animais que foram clonados nos últimos anos a partir de células não embrionárias estão com problemas. Entre os diferentes defeitos observados nos pouquíssimos animais que nasceram vivos após inúmeras tentativas, observa-se: telômeros

encurtados; placentas anormais; gigantismo em ovelhas e gado; defeitos cardíacos em porcos; problemas pulmonares em vacas, ovelhas e porcos; problemas imunológicos; falha na produção de leucócitos; defeitos musculares em carneiros.

De acordo com Hochedlinger e Jaenisch (2003), os avanços recentes em clonagem reprodutiva permitem quatro conclusões importantes: 1) A maioria dos clones morre no início da gestação; 2) os animais clonados têm defeitos e anormalidades semelhantes, independentemente da célula doadora ou da espécie; 3) essas anormalidades provavelmente ocorrem por falhas na reprogramação do genoma; 4) a eficiência da clonagem depende do estágio de diferenciação da célula doadora. De fato, a clonagem reprodutiva a partir de células embrionárias tem mostrado uma eficiência de 10 a 20 vezes maior provavelmente porque os genes, que são fundamentais no início da embriogênese, estão ainda ativos no genoma da célula doadora.

Neste trabalho, linhagens de células-tronco embrionárias bovinas foram isoladas a partir da massa celular interna de embriões bovinos produzidos in vitro a fim de se tornarem, no futuro, fontes de células-tronco embrionárias bovinas, serem modificadas geneticamente e utilizadas para a transferência nuclear na obtenção de bovinos transgênicos.

## CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

PERÍODO 2006	ATIVIDADE	RESULTADOS
Agosto 18-25	Estudo de papers e protocolos técnicos	
Agosto 28	Cultivo de feeders cells (monocamada celular), repique e congelação	
Agosto 28-01 Setembro	Preparo de meio de cultura (Mouse ES cells)	
Setembro	Cultivo de Mouse ES cells, repique e congelação	As células-tronco embrionárias de camundongos são aptas a receberem tais tratamentos e continuam viáveis após repique e congelação por pelo menos 5 meses de trabalho laboratorial
Outubro	Cultivo de embriões bovinos <i>in vitro</i> e início da capacitação manual e a laser para tentativa de remoção de células-tronco embrionárias bovinas	A fonte utilizada para a remoção das células-tronco bovinas foi proveniente de embriões D-7 ou D-12, produzidos <i>in vitro</i> (em torno de 25 embriões/ semana) para a demanda de estudos do laboratório
Novembro	Cultivo de Células-tronco humanas (hESC) transformadas com GFP	Detecção de células transformadas com gene de interesse e isolamento com base na separação a laser.
Dezembro	Aprimoramento das técnicas de remoção de células-tronco embrionárias bovinas e as primeiras colônias	Crescimento de colônias tronco embrionárias bovinas, estabelecimento das culturas e detecção molecular de marcadores tanto para células-tronco quanto para células bovinas.
Fevereiro-Abril	Preparação do Relatório técnico	
Maio	Entrega e baixa no CNPq	
Ano de 2007	Preparação de papers e tese de doutorado	
Março de 2008	Defesa de dissertação de doutorado	

Segundo cronograma descrito, esta parte do projeto foi desenvolvido como Doutorado Sanduíche na Universidade de Wisconsin – Madison - nos Estados Unidos.

## **OBJETIVOS**

O objetivo geral deste projeto consistiu no desenvolvimento de linhagens celulares bovinas por meio do isolamento de células-tronco embrionárias bovinas a fim de utilizá-las no futuro como fontes doadoras de núcleos transgênicos na produção de animais biorreatores.

A perspectiva futura de aplicação deste projeto é avaliar a taxa de produção de embriões transgênicos e a taxa de prenhez quando comparadas duas fontes doadoras de núcleos transgênicos: células somáticas transfectadas (fibroblastos bovinos) e células-tronco embrionárias bovinas transfectadas.

## **RESULTADOS**

- 1) Isolamento e desenvolvimento de colônias clones provenientes de células-tronco embrionárias humanas expressando o gene da GFP (Green Fluorescent Protein);
- 2) Seleção via isolamento a laser e expansão *in vitro* de eventos elites de células-tronco embrionárias humanas, segundo a expressão;
- 3) Criopreservação das linhagens de células-tronco humanas transfectadas;
- 4) O cultivo pós-descongelamento das linhagens de células-tronco humanas transfectadas para a detecção de sua viabilidade e manutenção de sua totipotencialidade.

- 5) Produção *in vitro* de embriões bovinos como fontes doadoras do botão embrionário;
- 6) Isolamento de células-tronco bovinas a partir do botão embrionário de embriões;
- 7) Comparação das duas técnicas de isolamento de células-tronco embrionárias bovinas: isolamento via laser e isolamento manual;
- 8) Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias bovinas aptas para a transfecção *in vitro*;
- 9) Geração das primeiras linhagens celulares bovinas provenientes do isolamento de células-tronco embrionárias bovinas como fontes de núcleos transgênicos, na geração de animais geneticamente modificados para a produção de recombinantes de interesse bioindustrial.

## **METODOLOGIA**

### **Cultivo de Fedders cells (Monocamada celular)**

A monocamada celular de Fedders cells (fibroblastos de camundongos) é crucial para o preparo do condicionamento do meio de cultivo celular previamente à adição de células-tronco, tanto humanas quanto embrionárias bovinas. Essa monocamada permite a aderência das colônias de células-tronco, além do condicionamento do meio de cultivo em que receberá as células-tronco.

O meio de cultura para as Fedders cells é denominado MEF.

#### **Meio de Cultura: MEF**

D-MEM	405 mL
FCS (Fetal Calf Serum)	75 mL
L-Glutamine	5 mL
NEAA	5 mL
Gentamycin	5 mL
HEPES	5 mL
Total	500 mL

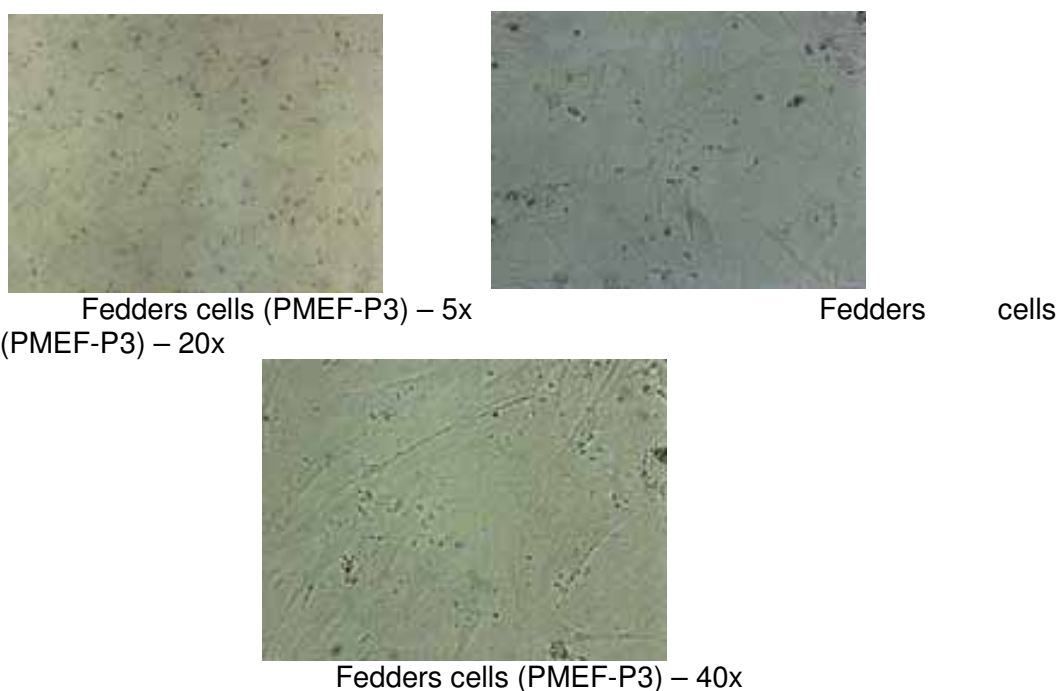
Para o cultivo das células fedders (monocamada) foram utilizadas 5 placas de Petri previamente tratadas com “Ultrapure water with 0,1% gelatin” (filtrada e acondicionada a T°C ambiente). Foi adicionada 10 mL da solução acima e deixou-se por 30 minutos para o tratamento eficaz das placas que receberam as células fedders.

Descongelou-se uma alíquota de células PMEF-P3 (Neomicina resistente) para o cultivo de 5 placas de Petri. Centrifugou-se e ressuspendeu-se com 5 mL de meio de cultura MEF para fedders cells e adicionou-se 1 mL de meio + células em cada placa de Petri tratada, completando com 4 mL de meio adicionais/placa.



Incubou-se as placas por cerca de 24 horas antes da adição das Mouse Embryonic Stem Cells.

Para a manutenção das células feeders deve-se repicá-las a cada 2 ou 3 dias de cultivo quando atingem a confluência.



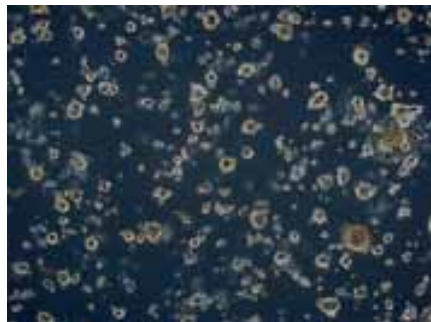
**Figura 1.** Fotos em diferentes zoom da cultura de fibroblastos de camundongos utilizados como monocamada base para o cultivo de linhagens embrionárias de células-tronco de outras espécies.

### **Repique de Embryonic Stem Cells – ES cells (Células-tronco embrionárias)**

Atendida a confluência das placas contendo células-tronco + Feeders cells, mais ou menos a cada 3 dias de cultivo celular, é necessário a renovação das células e a redução da densidade celular em cada placa de cultura a fim de se evitar a morte por apoptose devido a alta concentração de células.

Para se realizar o repique das células-tronco humanas, de camundongos e embrionárias bovinas utilizou-se o protocolo a seguir:

- Pré-lavagem das placas com 5 mL de PBS;
- Adicionou-se 5 mL de Trypsin-EDTA na placa contendo ES cells;
- Esperou-se por 10 minutos a 37°C (dentro da incubadora);
- Recolheram-se as ES cells + as células feeders + Trypsin, num tubo Falcon de 15 mL;
- Adicionou-se 5 mL de ES media no tubo, a fim de paralisar a ação da Tripsina;
- Centrifugou-se por 4 minutos a 1000 rpm;
- Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 10 mL de ES media, homogeneizando bastante para a obtenção de single cells;
- Diluiu-se 1:4 as células;
- Substituiu-se o meio de cultura das placas de feeders adicionando-se 5 mL de ES media + ES cells;
- Adicionou-se mais 5 mL de ES media em cada placa;
- Cultivou-se a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, com alta umidade.



**Figura 2.** Colônias ES cells de camundongos recém-repicadas – 5x.

## 1X Freezing Media (Meio de Congelação de células)

A cada repique celular se faz necessária a criopreservação das células em cultura a fim de se evitar algum risco de contaminação posterior da cultura e a perda da passagem celular em que as células se encontravam.

A identificação de cada passagem é importante para estudos de viabilidade celular em cultura, uma vez que essas células podem ser usadas como doadoras dos núcleos transgênicos utilizando a transferência nuclear.

O meio de congelação das células e o protocolo estão descritos a seguir:

ES media + LIF	5 mL
FCS (Fetal Calf Serum)	4 mL
DMSO	1 mL
Total	10 mL

- Pré-lavagem das placas com 5 mL de PBS;
- Adicionou-se 5 mL de Trypsin-EDTA na placa contendo ES cells;
- Esperou-se por 10 minutos a 37°C (dentro da incubadora);
- Recolheram-se as ES cells + as células feeders + Trypsin, num tubo Falcon de 15 mL;
- Dissociou-se as colônias a fim de congelá-las como single cells;
- Adicionou-se 5 mL de ES media no tubo, a fim de paralisar a ação da Tripsina;
- Centrifugou-se por 4 minutos a 1000 rpm;
- Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 2 mL de 1X Freezing media pré-resfriado;
- Imediatamente, transferiu-se 1 mL da suspensão para cada vial de congelação;

- Transferiu-se os vials para uma caixa pré-resfriada com Isopropanol no seu interior a -80°C;
- Após 24 ou 48 horas, transferiu-se os vials para o botijão de Nitrogênio Líquido.

### **Mouse Embryonic Stem Cells Media: Knock Out mES Media**

A fim de se cultivar células-tronco embrionárias de camundongos e embrionárias bovinas, o meio de cultivo foi elaborado de acordo com protocolo abaixo:

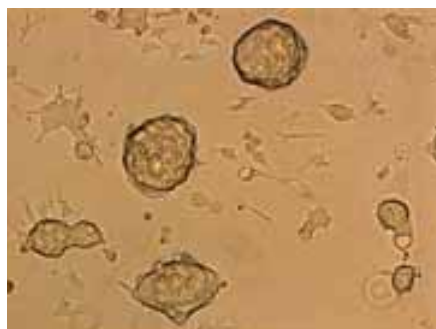
Knock out D-MEM	300 mL
FCS (Fetal Calf Serum)	54 mL
NEAA	2.4 mL
L-Glutamine	2.4 mL
Gentamycin	0.4 mL
B-Mercaptoethanol	250 µL
LIF	30 µL
Total	300 mL

\* Homogeneizar e filtrar 0.22 µ

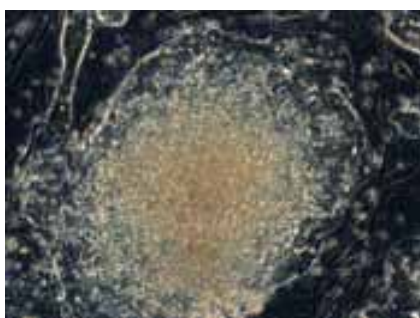
O Meio de Cultura base é preparado e acondicionado a 4°C.

Deve-se filtrar o meio após fazê-lo e acondicioná-lo por no máximo 2 semanas.

O Reagente LIF é utilizado em adição à monolayer (feeders) para a manutenção da totipotência das células.



ES cells – recente repicadas – 5x



Início Diferenciação  
20x



Colônia Indiferenciada  
20x

**Figura 3.** Colônias ES cells recém-repicadas, indiferenciadas e em início de diferenciação.

### human embryonic stem cells - hESC - Culture Media

A fim de se cultivar células-tronco embrionárias humanas, o meio de cultivo foi elaborado de acordo com protocolo abaixo:

D-MEM F12 Media	200 mL
Knockout Serum Replacer	50 mL
L-Glutamine (200 mM)	1.25 mL
NEAA (100X solution)	2.5 mL
Gentamycin	0.4 mL
B-2-Mercaptoethanol (BME)	0.85 µL
B-FGF stock solution (in the freezer)	0.5 mL

\* Homogeneizar e filtrar 0.22 µ

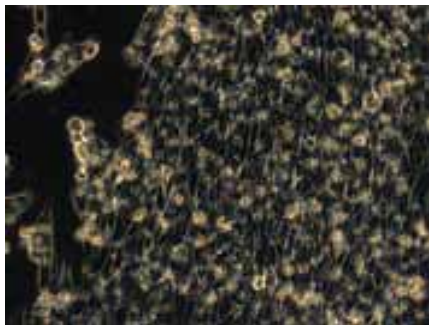
**B-FGF stock solution**  
**(Basic Fibroblast Growth Factor – bFGF, human recombinant, Invitrogen, USA)**

- Preparou-se 0.1% BSA em DPBS:
  - 0.3 g BSA em um tubo Falcon de 50 mL.
  - adicionou-se 30 mL de DPBS e homogeneizou-se bem.
  
- Separou-se 5 mL da solução 0.1% BSA em DPBS:
  - Tubo B-FGF (10 µg) e homogeneizou-se.
  
- Aliquotou-se 500 µL em cada eppendorf e identificou-se;
- Acondicionou-se a – 20 °C.

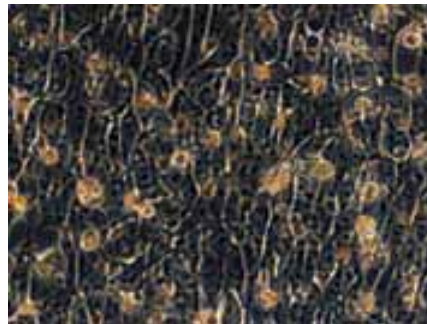
**Cultivo de Human Embryonic Stem Cells modified with Green Fluorescent Protein hESC (ATCC – PubMed: 12529550)**

O meio hESC foi condicionado em MEF media durante 24 horas para ser utilizado em placas contendo as colônias GFP hESC.

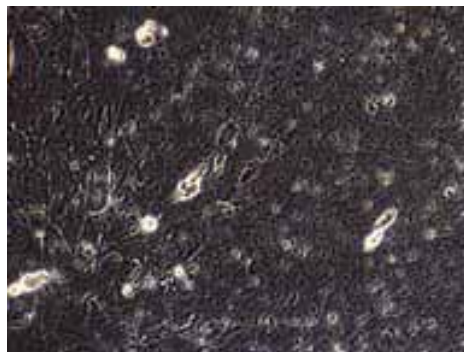
A cada 24 horas o meio MEF era coletado (18 mL), adicionado B-FGF (140 µL), filtrado e adicionado às placas contendo a cultura das células GFP hESC.



GFPPhESC – 20x - phase



GFPPhESC – 40x - phase



GFPPhESC – 20x - phase

**Figura 4.** Colônias human ES cells transformadas com GFP em diferentes zoom sob contraste de fase.

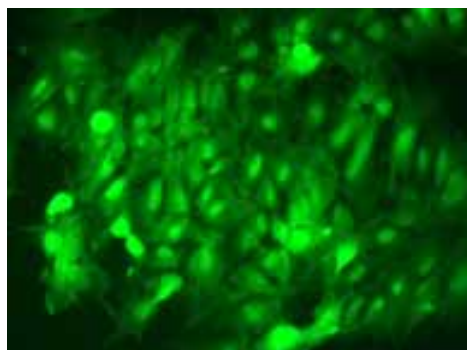
### **Isolamento das células GFPPhESC via laser**

1. Detecção do tapete de células-tronco embrionárias humanas transformadas com GFP, baseada na fluorescência das células após excitação com Ultra-violeta e filtro de visualização verde;

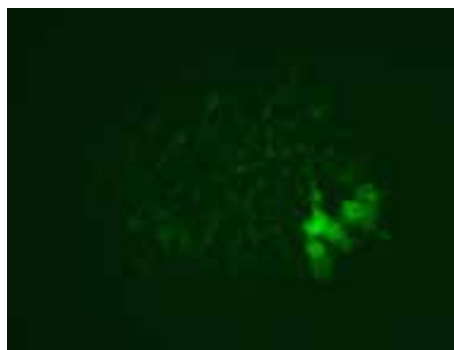
2. Imediatamente após a detecção das células potencialmente modificadas, foi ajustado o equipamento a laser nas seguintes especificações: Objetiva 10X; Robot LPC; UV Energy slides 46; UV Focus slides 73;

3. Foi aplicado o laser às células e recolhidas no “cap” (pequena quantidade de meio de cultura para o acondicionamento de apenas 1 célula) do equipamento;

4. Imediatamente após a colheita, as células foram colocadas em placas de Elisa para o crescimento isolado das colônias humanas com GFP.



Tapete celular: todas as células transformadas com GFP  
10x - Fluorescência



Colônia quimera: algumas células transformadas com GFP  
10x - Fluorescência



Célula isolada GFP  
5x - Fluorescência

Colônia isolada GFP  
10x - Fluorescência

**Figura 5.** Colônias human ES cells transformadas com GFP em diferentes zoom sob incidência de Ultra-Violeta.



### **Cultivo de embriões bovinos *in vitro***

(Greve et al., 1991; Krimpenfort et al., 1991; Carolan et al., 1992; Bols et al., 1995; Peixer et al., 1997; Rumpf et al., 2000)

O Cultivo *in vitro* de embriões bovinos foi realizado no Laboratório sob responsabilidade do Dr. Rick Monson e supervisão do Dr. Dave.

O protocolo utilizado foi desenvolvido no próprio laboratório dos pesquisadores, baseado nas diversas bibliografias sobre o assunto. Devido a isso, o protocolo não foi autorizado para a descrição de seus componentes.

Foi produzido um total de 260 embriões conforme tabela abaixo:

**Tabela 1.** Produção de embriões *in vitro* como fonte do botão embrionário para a remoção das células-tronco embrionárias bovinas.

<b>Data</b>	<b>Ovócitos/clivagem</b>	<b>D7 Blastocistos</b>	<b>D8 Blastocistos</b>
5/Set/2006	76	11	7
12/Set/2006	58	12	5
19/Set/2006	59	12	9
2/Out/2006	83	14	10
9/Out/2006	38	0	3
16/Out/2006	56	----	15
23/Out/2006	77	7	5
30/Out/2006	131	10	11
6/Nov/2006	154	7	17
13/Nov/2006	144	----	30
20/Nov/2006	105	0	9
27/Nov/2006	119	11	19
4/Dez/2006	124	9	17
11/Dez/2006	61	10	----
<b>TOTAL</b>	<b>1285</b>	<b>260 embriões</b>	

## **PROCEDIMENTOS FIV**

### **DIA -2: Aspiração folicular**

1. Os ovários eram coletados em um frigorífico, e transportados em caixas térmicas em torno de 30 °C, por meio de transporte aéreo;
2. No laboratório, eram lavados em água corrente e aquecida em torno de 35 °C e prontos para serem aspirados;
3. Eram utilizadas agulhas descartáveis calibre 40x12 para a aspiração dos folículos sob vácuo de aproximadamente 10 mmhg;
4. Os ovócitos eram coletados em tubos Falcon de 50 mL, e quando repletos, eram imediatamente transferidos para placas de Petri grande para serem rastreados e avaliados;
5. A medida que os ovócitos eram selecionados, eram colocados em placas de Petri pequenas, contendo o meio de seleção de ovócitos apropriado (Protocolo não autorizado a ser divulgado).

### **DIA -1: Maturação dos ovócitos**

1. Após serem selecionados, os ovócitos de graus 1, 2 e 3 eram colocados em placas contendo gotas de meio de cultura apropriado para a maturação ovocitária (Protocolo não autorizado);
2. Ficavam durante 18 a 24 horas dentro de incubadoras apropriadas para a maturação.

### **DIA 0: Fertilização dos ovócitos maturados**

1. Os ovócitos maturados por 24 horas eram pré-lavados (para a remoção de qualquer resíduo de meio de cultura de maturação) e eram transferidos

- para outras placas contendo gotas de meio de cultura apropriado para a fertilização ovocitária (Protocolo não autorizado);
2. O sêmen era preparado por meio de gradiente específico para a separação de espermatozóides viáveis para a fertilização dos ovócitos;
  3. As gotas inseminadas eram colocadas durante 24 horas em incubadora apropriada para a fertilização;

#### **DIA 1 ao DIA 7: Cultivo dos embriões**

1. Os ovócitos fertilizados por 24 horas eram pré-lavados (para a remoção de qualquer resíduo de meio de cultura de fertilização) e eram transferidos para outras placas contendo gotas de meio de cultura apropriado para o cultivo embrionário (Protocolo não autorizado);
2. Os embriões eram cultivados durante 7 dias em incubadora apropriada para o desenvolvimento embrionário;
3. No Dia 7, uma parte dos embriões era disponibilizada para o laboratório de Stem Cells, sob a supervisão da Dra Gabriela Cezar, para a tentativa de isolamento manual de células-tronco embrionárias bovinas;
4. A outra parte era cultivada até o Dia 10, em meio de cultivo apropriado para ES cells, em que os embriões, então, eram utilizados para o isolamento a laser de células-tronco embrionárias bovinas.

## **Isolamento de células-tronco embrionárias bovinas**

A fonte utilizada para a remoção das células-tronco bovinas foi proveniente de embriões D-7 ou D-12 produzidos *in vitro*.

Foram estabelecidas duas técnicas para a remoção das células-tronco: técnica manual e técnica a laser.

### **Isolamento Manual**

(BEM et al., 1987; RUMPF et al., 1992)

Foram utilizados embriões D-7 para a remoção manual de células-tronco.

Utilizou-se um sistema manual de micromanipulação em que as células do botão embrionário foram removidas precisamente por meio de navalhas ultra-finas (Bio-technology – USA) a fim de causar menor dano às células isoladas por este método.

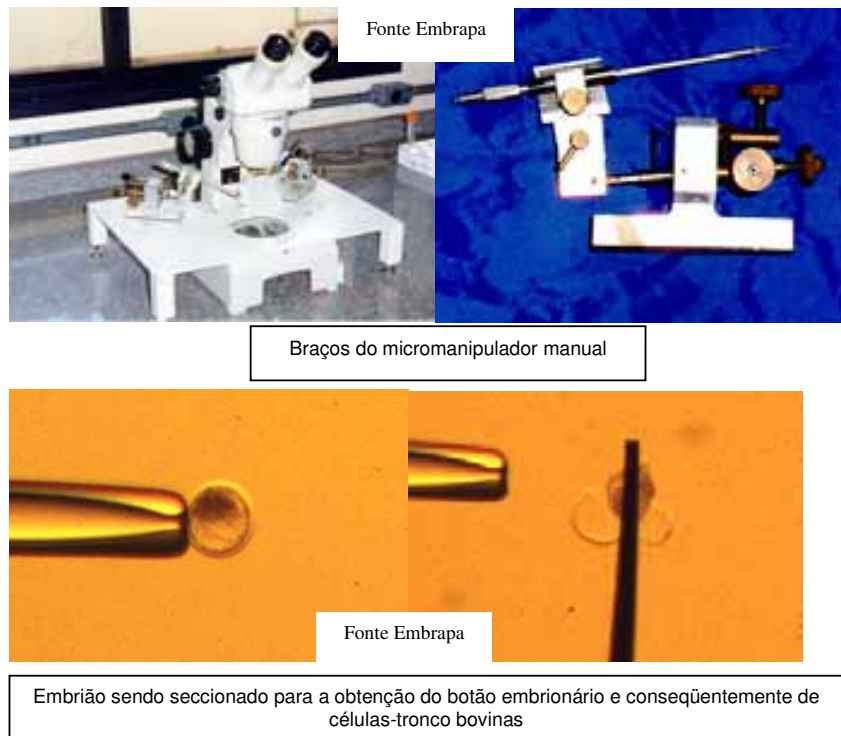
Foram obtidas 05 colônias-tronco por este sistema de isolamento que foram submetidas a análises moleculares para a certificação da pluripotência celular (compatível com células-tronco).

A técnica consistiu em escolher embriões Grau I de classificação (IETS, 2000), separá-los um a um em gotas individuais para que a remoção do botão embrionário se dê individualmente, evitando a contaminação celular entre embriões.

Uma vez individualizado o botão embrionário, este foi seccionado o mais precisamente possível, evitando a contaminação com as células do trofoblasto do próprio embrião. O trofoblasto inibe o desenvolvimento das células do botão embrionário e não mantém a pluripotência destas.

Imediatamente após a secção, o botão embrionário foi transferido para placas de 04 poços (Nunc, USA), contendo meio ES cells (sem a adição de reagente LIF), em incubadora apropriada. Houve crescimento celular durante os 05 meses de treinamento, em que pudemos observar as primeiras colônias no mês de Dezembro de 2006.

Testes subseqüentes foram feitos no mês de Janeiro de 2007 pela equipe do laboratório da Dra. Gabriela Cezar a fim de detectar marcadores moleculares compatíveis com o desenvolvimento de células-tronco embrionárias bovinas.



**Figura 6.** Isolamento manual do botão embrionário de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

**Isolamento a laser**  
(P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, 2003)

Foram utilizados embriões D-12 para a remoção manual de células-tronco.

Após o D-7 os embriões foram transferidos para a placa de petri apropriada para a manipulação a laser contendo meio ES cells.

Foram cultivados durante 3 dias e incubados na estufa até que os embriões atingissem a fase de eclosão celular.

Uma vez eclodidos, os embriões fixaram-se à membrana da placa utilizada no equipamento a laser e não se moveram no momento da incidência do laser.

Utilizou-se o sistema Laser Pressure Catapulting LPC – P.A.L.M. Microlaser Technologies (Quick Software Guide MB 2.2-0103 (EN) em que as células do embrião são demarcadas pelo laser, há a incidência de laser às células, o isolamento do grupo celular selecionado e a sucção deste grupo individualizado.

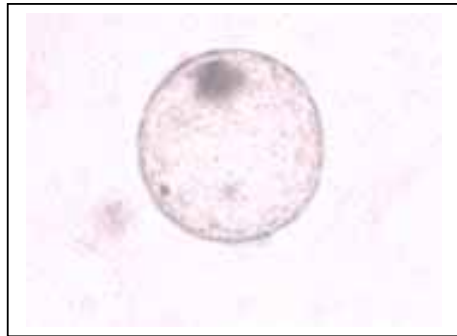
O equipamento foi ajustado para tais padrões: inicialmente: Objetiva 40x, Robot LPC; UV Energy slides 37; UV Focus slides 50; ocorrendo ajustes de laser e focus ao longo do processo e a cada novo embrião.

As células removidas por este sistema foram isoladas a cada embrião manipulado e colocadas em placas de 96 poços. A cada semana foram repicadas e removidas para novos poços.

Não foram obtidas colônias-tronco por este sistema de isolamento devido a idéia da fixação dos embriões após o cultivo prolongado de 12 dias ter surgido 1 mês antes do término do estágio no exterior.

Este método está em procedimento no laboratório a fim de testar a eficácia deste processo.

**Figura 7.** Embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes fases do desenvolvimento, utilizados para o isolamento via laser de seu botão embrionário.



Embrião bovino produzido *in vitro* – D7



Embrião bovino produzido *in vitro* – D12  
Pós-eclosão, Fixado à placa e Pré-laser



Embrião bovino 24 h pós-laser – D13  
Desaparecimento do botão embrionário

Colônias de Células-tronco Embrionárias Bovinas – Sistema de Isolamento manual



Colônia 1. Células-tronco embrionárias bovinas – 20x



Colônia 2. Células-tronco embrionárias bovinas – 20x



Colônia 3. Células-tronco embrionárias bovinas – 5x



Colônia 1. Células-tronco embrionárias bovinas – 5x



Colônia 4. Células-tronco embrionárias bovinas – 5x



Colônia 5. Células-tronco embrionárias bovinas – 5x

**Figura 8.** Cinco (5) Colônias de Células-tronco Embrionárias Bovinas isoladas pelo Sistema de Isolamento manual.



## DISCUSSÃO

Um dos objetivos da biotecnologia animal é a aplicação de técnicas atuais da engenharia genética para a produção de animais de grande porte com características desejáveis. Atualmente, genes exógenos podem ser introduzidos no genoma de camundongos via “embryonic stem cells” (*ES cells*) (Nagy et al., 1990) e por meio de técnicas de recombinação homóloga. Neste sistema, as culturas de *ES cells* de camundongos podem ser usadas como uma ferramenta para a adição, a deleção ou silenciamento de genes em locais específicos do genoma. Além disso, *ES cells* têm a capacidade de desenvolvimento estável para formar células derivadas das três camadas de células germinativas embrionárias, e diferenciação bem sucedida *in vitro* em neurônios, em células hematopoiéticas e em músculo cardíaco.

O isolamento de linhagens pluripotentes de *ES cells* humanas de blastocistos tem sido também relatado (Rhind et al., 2003; kim et al., 2005). Em vista da provável contribuição significativa de *ES cells* aos esforços em manipular o genoma, e para substituir vários tecidos e órgãos lesionados, parece apropriado tentar adaptar esta tecnologia à melhoria genética de animais de grande porte e para gerar produtos transgênicos. À exceção dos camundongos e do homem, os carneiros (Dattena et al., 2006), o porco (Piedrahita et al., 1990), o coelho (Chiang et al., 2007), os bovídeos (Keefer et al., 1994; Verma et al., 2007), o rato (Ouhibi et al., 1995), e o macaco (Mitalipov et al., 2003) tem sido relatados como potenciais fontes doadores de *ES cells*.

O método usado para o isolamento de *ES cells* humanas foi adaptado às outras espécies com algumas modificações. Entretanto, tentativas preliminares

de cultura da massa interna celular (ICM) de várias espécies sobre camada de *feeders cells* embrionárias de camundongos ou sobre cultura primária de fibroblastos de camundongos na presença do fator inibitório da leucemia (*LIF*) foram raramente bem sucedidas. Uma combinação de fatores de crescimento pode ser requerida para a proliferação destas células pluripotentes, como foi demonstrado no cultivo de células de linhagens primordiais de camundongos (Tielens et al., 2006). No nosso estudo, *ES cells* bovinas, isoladas da massa interna de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, só foi possível quando cultivada sobre camada de *ES cells* de camundongos, fornecendo, dessa maneira, meio de cultivo condicionado por tais células em crescimento concomitante.

Mas o desenvolvimento de linhagens clones de *ES cells* possui a habilidade em ser estudadas seqüências, regulação, ou expressão gênica, geradas a partir de uma única célula, isoladas de tecidos especializados e utilizadas como fontes doadoras das células em estudo.

Com base nisso, a necessidade em se desenvolver técnicas de isolamento de células a partir dos tecidos em estudo, gerou a necessidade de se isolar células-tronco a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro*, como expectativa no uso dos núcleos transfectados para a geração futura de bovinos transgênicos utilizados como biorreatores.

Uma das maiores preocupações no estabelecimento dessa técnica é a tentativa de descartar qualquer possibilidade de contaminação por células circunvizinhas, no momento de seu isolamento. A contaminação é eliminada e as células isoladas podem ser processadas e desenvolvidas como linhagens puras e como fontes potenciais para a transfecção *in vitro*.

Uma vez transfectadas, dentre os trilhões de células geradas como pool no tapete celular, pode-se utilizar a incidência a laser a fim de detectar apenas as células transfectadas desse tapete. Os procedimentos baseados na PCR são usados posteriormente para a amplificação das seqüências de DNA/RNA inseridas (Shutze e Lahr, 1998), enquanto que métodos tais como espectrometria de massa podem ser usados para determinar seqüências de aminoácidos dos polipeptídeos que são gerados pela expressão gênica da linhagem clone gerada (Jimenez et al., 1994).

Além da aplicação potencial da transgenia animal, os biólogos celulares e moleculares têm um objetivo experimental adicional para isolar preparações não contaminadas de células únicas isoladas da cultura de tecidos. Tais células podem ser examinadas, manipuladas, e potencialmente clonadas na tentativa em fornecer mais material biológico para análises e sistemas menos complexos para estudos dos processos biológicos sadios e dos mutantes.

O sistema baseado a laser foi desenvolvido para circunscrever e isolar células vivas a partir de tecido vivo ou células não-viáveis de regiões de tecidos fixos. O método envolve a fixação das regiões do tecido de interesse a uma película termoplástica na qual elas se ligam e crescem. A película usada para a microdissecção e para o isolamento das células é aderida a uma placa de cultura e tratada especialmente para absorver a luz do laser. Desse modo, as células/grupos individuais de células das regiões do tecido que são escolhidas para serem catapultadas são isoladas (Fend et al., 2000), e conseqüentemente colocadas em meio de cultura específico para o desenvolvimento de linhagens clones (Stich et al. 2003).

A técnica a laser fornece a oportunidade de usar células únicas isoladas de tecidos vivos saudáveis e tumorais para análises funcionais ou na preparação de bibliotecas clonais para investigações diversas na biologia celular, farmacologia, desenvolvimento de drogas, testes ambientais, e para o desenvolvimento de vacinas personalizadas de encontro aos tumores específicos.

A seleção, o isolamento e a análise das células vivas dos tecidos que expressam quimeras das proteínas fluorescentes verdes (GFP) e análises subsequentes de função ou da expressão das células transformadas com GFP são também aplicações possíveis. Nesse estudo, células-tronco embrionárias humanas transfectadas com GFP, foram utilizadas para o teste do isolamento de células individuais via aplicação de laser e a viabilidade celular de crescimento pós-isolamento. O crescimento de colônias clones de células-tronco embrionárias humanas foi possível ao se utilizar as células isoladas via laser e cultivá-las sobre monocamada celular de *feeders cells* de camundongos.

Baseado nisso, a técnica de isolamento via laser e via manual abre uma perspectiva futura viável para a geração de linhagens clones de células-tronco para estudos de função gênica, de expressão gênica e na geração de núcleos transformados com genes exógenos, principalmente de interesse farmacológico, como fontes doadoras desses núcleos para a transferência nuclear e à geração de animais biorreatores.

## CONCLUSÃO

É extremamente importante que as pessoas entendam a diferença entre clonagem humana, clonagem terapêutica e terapia celular com células-tronco embrionárias ou não. A maioria dos países da comunidade europeia, o Canadá, a Austrália, o Japão, a China, a Coreia e Israel aprovaram pesquisas com células embrionárias de embriões até 14 dias. Essa é também a posição das academias de ciência de 63 países, inclusive o Brasil. É fundamental que a nossa legislação também aprove estas pesquisas porque elas poderão salvar inúmeras vidas.

Essas 63 academias de ciência do mundo que se posicionaram contra a clonagem reprodutiva defendem as pesquisas com células embrionárias para fins terapêuticos. Em relação aos que acham que a clonagem terapêutica pode abrir caminho para clonagem reprodutiva devemos lembrar que existe uma diferença intransponível entre os dois procedimentos: a implantação ou não em um útero humano. Basta proibir a implantação no útero. Se pensarmos que qualquer célula humana pode ser teoricamente clonada e gerar um novo ser, poderemos chegar ao exagero de achar que toda vez que tiramos a cutícula ou arrancamos um fio de cabelo, estamos destruindo uma vida humana em potencial. Afinal, o núcleo de uma célula da cutícula poderia ser colocado em um óvulo enucleado, inserido em um útero e gerar uma nova vida!

A prática da clonagem-terapêutica suscita grandes dúvidas que exigem, por parte dos órgãos responsáveis estudo, bom senso e ética, para que não se legalize um comportamento que contrarie os interesses humanos e, por outro lado, abra um campo enorme à exploração indiscriminada.

Existem células-tronco em vários tecidos (como medula óssea, sangue, fígado) de crianças e adultos. Entretanto, a quantidade é pequena e não sabemos ainda em quais tecidos são capazes de se diferenciar. As células-tronco embrionárias são importantes fontes na medida em que fornecem resultados promissores no desenvolvimento embrionário *in vitro* de clones de animais domésticos após a técnica de transferência nuclear. Isso se dá pela potencial aplicação das células-tronco na possibilidade intrínseca de diferenciação celular em qualquer tecido adulto, e neste caso, em se comportarem como célula embrionária.

No Brasil, as pesquisas, ainda em andamento, indicam que as células embrionárias seriam capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos. Mas, a Lei de Biosegurança - que gera muitas polêmicas - só permite que sejam usadas para fins científicos e, no caso das humanas, após estarem armazenadas por mais de 3 anos, com o consentimento dos pais.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Os avanços na biotecnologia fizeram com que o DNA pudesse ser manipulado de maneira controlada, gerando espécies modificadas de ratos, camundongos, ovelhas, bovinos, cabras, suínos e até primatas. A geração de modelos transgênicos, como por exemplo, o camundongo, tornou possível a utilização de animais em experimentação produzidos em laboratório como fontes para estudo de características funcionais do homem que se desejam estudar.

A vantagem da aplicação de ferramentas de engenharia genética para o desenvolvimento de técnicas de produção de biofármacos e vacinas é a possibilidade de aumento do rendimento e da capacidade de produção, propiciando uma redução dos custos, assim como a possibilidade de melhor controle dos processos e qualidade dos produtos. O Brasil, hoje, depende da importação de biofármacos. As pesquisas no país pretendem contribuir para mudar esta realidade, por meio do desenvolvimento de tecnologias de ponta para a obtenção de produtos recombinantes.

A utilização de animais transgênicos tem demonstrado ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em larga escala e custos mais reduzidos, os quais têm recebido aceitação pelas agências de regulamentação responsáveis pela produção de fármacos. Apesar de inúmeras questões éticas envolvendo o tema esperarem soluções apropriadas, os animais transgênicos são muito promissores para a bioindústria, para diagnósticos clínicos e para estudos em pesquisa básica.

Sendo assim, a expressão do fator IX de coagulação biologicamente ativo em sistemas de expressão utilizando animais transgênicos, possibilitou a avaliação do funcionamento da expressão do recombinante em camundongos transgênicos (Lisauskas et al., 2008), justificando a aplicabilidade futura dos sistemas em bovinos transgênicos utilizados como biofábricas ou biorreatores.

O gene do *fator IX de coagulação humana* foi integrado por meio da transgenia por adição, o método mais utilizado na introdução de genes, e neste caso, do gene exógeno. Genes exógenos pertencem à outra espécie, neste caso espécie humana e são usados para fazer um animal produzir uma nova proteína, ausente na espécie receptora, neste caso camundongos.

Uma vez que a inserção do transgene no genoma hospedeiro, por esse método, até onde se sabe é aleatória, ela pode ser ineficaz ou até mesmo letal, devido ao local onde o gene está integrado ser incerto. Na primeira possibilidade, o transgene pode se inserir em uma região do cromossomo que dificulta ou inviabiliza a sua expressão, fazendo com que o animal não apresente o fenótipo em nível desejado. Na segunda, a inserção aleatória pode provocar, por exemplo, a inativação de um gene essencial ao desenvolvimento na fase embrionária, com conseqüente inviabilidade ou morte prematura do animal. Nesse caso, o fenótipo do animal transgênico é independente do transgene, ou seja, não foi causado por uma característica do gene inserido, mas pelo local onde esse gene se integrou. Uma questão importante em experimentos com animais transgênicos diz respeito ao “efeito de posição” dos genes e os efeitos da região na qual eles se inserem. Ou seja, devemos discutir os diferentes padrões da expressão do transgene no genoma hospedeiro, dependente de seu sítio de integração. Por causa dessas possibilidades, a comparação de várias



linhagens transgênicas com a mesma modificação genética é imprescindível para que se possa inferir a inserção não-deletéria de um gene ou tentar correlacioná-lo ao nível da expressão do transgene no local da inserção (Lisauskas et al., 2007). No intuito de aplicar esse modelo de estudo na geração de eventos elites de expressão dos transgenes, a chamada modificação genética dirigida ou controlada (genes-alvo) é o método empregado para a modificação e inativação de genes que exige o conhecimento de sua localização no genoma. Essa técnica possibilita substituir um gene funcional por uma seqüência mutada que, uma vez introduzida, inativa o gene endógeno original, gerando um animal conhecido como modelo knock-out. Da mesma forma, é possível alterar uma pequena seqüência do gene, gerando um modelo knock-in que produzirá uma proteína modificada em vez da proteína endógena presente no animal. O termo knock-in se deve ao fato de o gene endógeno ser retirado do genoma e substituído por outro com uma pequena modificação.

Várias técnicas são utilizadas para produzir animais transgênicos por adição de segmentos de DNA ao genoma - entre elas, a microinjeção pronuclear de embriões, a transferência de DNA mediada por espermatozoides, a infecção de embriões por vetores retrovirais, a transferência de DNA mediada por transposons, a injeção de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas, a transferência nuclear de células geneticamente modificadas. Dentre todos esses procedimentos, a microinjeção pronuclear é o mais utilizado na produção de camundongos transgênicos. A taxa de integração do DNA no genoma embrionário é baixa - cerca de 1% a 6% (Lisauskas et al., 2008). Ou seja, apenas alguns animais nascidos carregarão o transgene integrado em seus cromossomos. A integração do transgene por microinjeção, como dito

anteriormente, ocorre de forma aleatória no genoma, e todas as células do animal são geneticamente modificadas, inclusive as germinativas, de modo que essa alteração será transmitida aos seus descendentes. Todo animal transgênico positivo originado de um embrião microinjetado é classificado como fundador de uma linhagem transgênica única, que difere de outro fundador quanto ao local de inserção e ao número de cópias do transgene no genoma. Outro método a ser aplicado na geração de camundongos geneticamente modificados consiste no isolamento e manutenção de células-tronco indiferenciadas *in vitro* e, posteriormente, com a modificação genética destas e injeção em embriões receptores, pode-se produzir camundongos quiméricos. Isso provou definitivamente que essas células são capazes de iniciar o processo de diferenciação e produzir um indivíduo completo. As células-tronco embrionárias são totipotentes, ou seja, capazes de gerar qualquer tipo de tecido. Elas são oriundas de embriões na fase inicial de desenvolvimento, após cerca de quatro dias da fertilização do óvulo. O embrião nessa fase é denominado blastocisto e possui centenas de células-tronco na sua massa celular interna, que darão origem a todos os tecidos do organismo adulto. Atualmente, essa técnica é rotineiramente aplicada em camundongos, uma das únicas espécies - além da humana - em que se domina totalmente o cultivo de células-tronco embrionárias. Para outras espécies, há dificuldade em se manter indiferenciadas as células-tronco derivadas de embriões em cultura. No nosso trabalho, células-tronco embrionárias bovinas foram isoladas e cultivadas por longos períodos mantendo sua indiferenciação. O próximo passo ao isolamento de células-tronco embrionárias é a seleção daquelas geneticamente modificadas, e a técnica de eleição que se mostrou eficaz foi por meio da técnica a laser. As células

transfectadas podem formar linhagens clones e bancos de células para a futura produção de bovinos transgênicos.

Inúmeras são as aplicações potenciais da utilização de animais geneticamente modificados como modelos para o estudo das causas, da progressão, dos estágios e sintomas de doenças cardiovasculares, auto-imunes, neurológicas, entre outras. Ao se utilizar linhagens de células-tronco geneticamente modificadas pode-se permitir uma análise detalhada da fisiopatologia de doenças, propiciar também o desenvolvimento de novas formas de tratamento, novos testes diagnósticos, agentes terapêuticos mais eficazes e baratos, e o tão esperado estabelecimento de protocolos de terapia gênica.

Além disso, o transplante de órgãos e tecidos de animais em seres humanos, ou xenotransplante, é também foco de interesse no uso dos transgênicos. Existe carência mundial de órgãos para transplantes clínicos, e infelizmente muitos pacientes morrem na fila de espera. As vantagens do xenotransplante sobre os transplantes tradicionais incluem o suprimento ilimitado de órgãos e a conseqüente diminuição das filas de espera. Atualmente os pesquisadores desenvolvem porcos transgênicos cujos órgãos podem ser seguramente utilizados para transplante em humanos. Para isso, é preciso superar o sistema imunológico que reconhece e destrói todas as células que não possuem marcadores específicos humanos na sua superfície, ocasionando o fenômeno da rejeição. Para contornar esse problema, foram criados porcos transgênicos portadores de um gene que codifica uma proteína da superfície de células humanas. Como resultado, esses porcos possuem órgãos contendo marcadores de células humanas, o que impede que componentes do sistema imune do receptor ataquem e destruam o órgão transplantado. Paralelamente,

outros grupos de pesquisa estudam uma estratégia diferente para minimizar a rejeição de órgãos na xenotransplantação. Ela consiste em eliminar do genoma do porco, pelo método de knockout, o gene que codifica a  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase, uma enzima presente na superfície das células daquele animal que é reconhecida pelo sistema imunológico humano. Sem esta enzima, a primeira etapa na rejeição ao órgão transplantado não acontece. Apesar das boas perspectivas do xenotransplante, a utilização do método ainda é foco de inúmeros aspectos éticos que devem ser bastante discutidos.

Outra aplicação promissora dos transgênicos é na pecuária e indústria. Os métodos de seleção de características desejadas, como por exemplo, aumentar a produção de leite, estão baseados no cruzamento seletivo e convencional dos animais. Porém, o cruzamento seletivo é extremamente lento e dispendioso, além de ser um processo que não garante os resultados desejados. As novas técnicas de biologia molecular tornaram possível a introdução ou manipulação de características desejáveis nos animais, em menos tempo e com mais precisão. Como exemplo, citamos a geração de vacas transgênicas, manipulando-se genes endógenos, as quais produzem maior quantidade de leite/dia.

Na indústria farmacêutica um processo denominado "humanização de camundongos" utiliza-se desses modelos animais no desenvolvimento de novas drogas. Por meio desse processo, um gene é retirado do genoma do animal pela técnica de knock-out e, em substituição, um gene humano é inserido pelo método de adição gênica. Essa técnica deve facilitar enormemente o desenvolvimento de novos medicamentos, barateando os custos e diminuindo o tempo para uma nova droga chegar às farmácias. Outra importante aplicação da

transgenia animal é a produção de animais conhecidos como biorreatores. Estes são geralmente animais domésticos de médio e grande porte, utilizados para a produção de proteínas recombinantes humanas de grande interesse biológico e comercial, como enzimas, hormônios, fatores de crescimento, fatores da coagulação. Em geral a proteína de interesse é expressa no leite do animal, tornando sua produção mais barata e eficiente. Em 1997, o primeiro bovino transgênico, a vaca Rosie, produzia leite enriquecido com a proteína humana lactoalbumina. Esse leite transgênico é mais nutritivo para humanos que o leite natural, e poderia ser introduzido na alimentação de crianças com carência de nutrientes específicos. Há também pesquisas em curso voltadas para a produção de leite transgênico contendo as proteínas necessárias para o tratamento de doenças como fenilcetonúria, enfisema hereditário e fibrose cística. No nosso estudo, camundongas transgênicas produziram no leite o fator IX humano de coagulação. A proteína recombinante gerada foi testada e provou ser biologicamente eficaz na coagulação do sangue de pacientes hemofílicos.

O futuro da transgênese animal é indiscutivelmente o uso desses animais como biofábricas para a produção de proteínas recombinantes em benefício de nossa sociedade. Essa produção proporcionará ilimitada quantidade de medicamentos sendo produzidos de maneira abundante, além de fornecê-los a um baixo custo e podendo suprir bancos de hospitais, principalmente os da rede pública de saúde. Atualmente o Brasil dispense grandes quantidades de dinheiro pagas à importação de fármacos não produzidos pelas indústrias brasileiras. Com essa tecnologia, o país economizará fundos de investimentos em outras áreas precárias do país, como educação e segurança pública. Entretanto, apesar de as vantagens da utilização dos animais transgênicos, o Brasil ainda sofre com

os muitos obstáculos políticos e legais que rondam à frenagem de tal tecnologia. Em um país que atualmente sofre com a falta de dinheiro para a importação de produtos essenciais para a manutenção da qualidade de vida de pessoas portadoras de doenças raras, a precariedade da distribuição de medicamentos na rede pública de saúde, as constantes mortes de pessoas à espera de órgãos a serem transplantados, o alto custo na purificação de hemoderivados e o risco destes na transmissão de possíveis doenças, além da falta de estudos dos efeitos na aplicação de novas drogas manipuladas e distribuídas comercialmente, constitui um crime a tentativa de barrar a ascensão da nova tecnologia e permitir que os brasileiros, no futuro, aumentem as suas chances de cura ou de simples expectativa de vida proporcionada pelas novas abrangências de tal tecnologia. Baseado nesses aspectos, a tecnologia do DNA recombinante, bem como a engenharia genética que já estão disponíveis em nosso país vem ao encontro da concretização das possibilidades apontadas acima, se pessoas influentes em nosso país tentassem se interar dos benefícios, das possibilidades de longo alcance da tecnologia e dos reais riscos das técnicas em aplicação. Ao invés de trabalhar em leis e formas legais que vão de encontro aos reais benefícios para a população trazidos por esta tecnologia.

Essa positiva revolução da medicina, que envolverá a produção de recombinantes eficazes a baixo custo de produção, a produção ilimitada de órgãos para xenotransplantes, a manipulação de células-tronco humanas para a cura de doenças cuja única solução é o uso dessas células totipotentes, deve ser absorvida como única solução viável para o Brasil cuja precariedade é o adjetivo principal em todas as áreas de excelência do país.

## BIBLIOGRAFIA

- Aragão FJL, Ribeiro SG, Barros LM, Brasileiro ACM, Maxwell DP, Rech EL, Faria JC. 1988. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs showed delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic virus. *Molecular Breeding* 4: 491-499.
- ATCC – American Type Culture Collection. Cell Line Designation: G-Olig2. *National Stem Cell Resource*. ATCC Catalog n. SCRC-1037. PubMed: 12529550.
- Axelrod JH, Read MS, Brinkhous KM, Verma IM. 1990. Phenotypic correction of factor IX deficiency in skin fibroblasts of hemophilic dogs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 5173-5177.
- Belur LR, Frandsen JL, Dupuy AJ, Ingbar DH, Largaespada DA, Hackett PB, Mclvor DH. 2003. Gene insertion and long-term expression in lung mediated by the *Sleeping Beauty* transposon system. *Mol. Ther.*
- Bem AR de, Mariante AS, Trovo JBF, Vaske TR. 1987. Obtenção de gêmeos bovinos monozigóticos através da micromanipulação. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia 24, Brasília. *Anais*. Brasília: SBZ, p.356.
- Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, Kruif A. 1995. Transvaginal opum pick-up (opu) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Veterinary Vision* 3 (1): 1-6.
- Brackett BG, Boranska W, Sawicki W, Koprowski H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 353-357.

- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- Carolan C, Monaghan P, Mehmood A, Gallagher M and Gordon I. 1992. Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery. *J. Reprod. Fert. Abstract series n° 9.*, abstract 88, p. 51.
- Carrel A. 1912. On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 15: 516-528.
- Carver A, Dalrymple M, Wright G, Cottom D, Reeves D, Gibson Y, Keenan J, Barrass J, Scott A, Colman A and Garner I. 1993. Transgenic livestock as bioreactors: Stable expression of human Alpha-1-Antitrypsin by a flock of sheep. *Bio/Technology* 11: 1263-1270.
- Chan AW, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel RD. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14028-14033.
- Channon KM, Blazing MA, Shetty GA, Potts KE, George SE. 1996. Adenoviral gene transfer of nitric oxide syntase: high level expression in human vascular cells. *Cardiovasc. Res.* 32: 962-972.
- Chiang SK, Chang HH, Ou YW, Intawicha P, Cheng SP, Chen LR, Lee KH, Giles J, Ju JC. 2007. Successful Induction of Antisera Against Rabbit Embryos for Isolation of the ICM and Putative Embryonic Stem Cells. *Reprod Domest Anim.*
- Choo KH, Raphael K, McAdam W, Peterson MG. 1987. Expression of active human blood clotting factor IX in transgenic mice: use of a cDNA with complete mRNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 15: 871-884.



- Chrenek P, Ryban L, Vetr H, Makarevich AV, Uhrin P, Paleyanda RK, Binder BR. 2007. Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits. *Transgenic Res.* 16: 353–361.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. 1998. Cloned Transgenic Calves Produced from Nonquiescent Fetal Fibroblasts. *Science* 280.
- Clark AJ. 1998. The mammary gland as bioreactor: expression, processing and production of recombinant proteins. *Journal of Mammary Gland* 3: 337-349.
- Colman A. 1996. Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. *American Journal of Nutrition* 63: 639-645.
- Damak S, Su H, Jay NP, Bullock DW. 1996. *Bio/Technology* 14: 185.
- Dattena M, Chessa B, Lacerenza D, Accardo C, Pilichi S, Mara L, Chessa F, Vincenti L, Cappai P. 2006. Isolation, culture, and characterization of embryonic cell lines from vitrified sheep blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 73(1): 31-9.
- Day CD, Lee E, Kobayashi J, et al. 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* 14: 2869–2880.
- Denman JM, Hayes C, O'Day T, Edmunds C, Barlett S, Hirani KM, Gordon K, McPherson JM. 1991. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme *Bio/Technology* 9: 839-843.
- Devinoy E, Thérot D, Stinnakre MG, Fontaine ML, Grabowski H, Puissant C. 1994. High level production of human growth hormone in the milk of

- transgenic mice: the upstream region of rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Research* 3: 79-89.
- DiMaio D, Treisman R, Maniatis T. 1982. Bovine papillomavirus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacterial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4030-4034.
- Dobie KW, Lee M, Fantes JA, et al. 1996. Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 6659–6664.
- Drogemuller C, Peters M, Pohlenz J, et al. 2002. A single point mutation within the ED1 gene disrupts correct splicing at two different splice sites and leads to anhidrotic ectodermal dysplasia in cattle. *J. Mol. Med.* 80: 319–323.
- Egilmez NK, Iwanuma Y, Bankert RB. 1996. Evaluation and optimization of different cationic liposome formulations for *in vivo* gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 169-173.
- Eyestone WH. 1994. Challenges and progress in the production of transgenic cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 647-652.
- Feldman LJ and Isner JM. 1995. Gene therapy for vulnerable plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.* 26: 826-835.
- Felgner PL, Rignold GM. 1989. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337:387-388.
- Fend F, Kremer M, Quintanilla-Martinez L. 2000. Laser Capture Microdissection: Methodical Aspects and Applications with Emphasis on Immuno-Laser Capture Microdissection. *Pathobiology* 68: 209-214.

- Forsbach et al. 2003. A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Molecular Biology* 52: 161-176.
- Freshney RI. 1992. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford University Press, Oxford, England.
- Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. 1996. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1278: 41-50.
- Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, Kameda M, Kodaira K, Hirabayashi M, Suzuki T, Ueda M. 1999. Analysis of control elements for position-independent expression of human  $\alpha$ -lactalbumin YAC. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 1-7.
- Fujiwara Y, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Muramatsu T, Yamanaka H, Sekikawa K. 2003. Analysis of the flanking regions of the human  $\alpha$ -lactalbumin gene responsible for position-effect independent expression. *Gene* 305: 71-78.
- Gandolfi F. 2000. Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology* 53:127137.
- Gavin WG. 2001. The future of transgenics. *Regulatory Affairs Focus*: 13-18.
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Hennighausen L. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* 5: 1183-1187.
- Greve T, Madison V. 1991. *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reprod. Utr. Dev.* 31: 147-157.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CEJ, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD & Brister RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection *Nature* 315: 680-683.

- Harrison RG. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4: 140-143.
- Haskell RE, Bowen RA. 1995. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 386-390.
- Hochedlinger K, Jaenisch R. 2003. Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy *N. Engl. Journal of Medicine* 349: 275-212.
- Honn KV, Singley JA and Chavin W. 1975. Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Experimental Biology and Medicine* 149: 344-347.
- Houdebine LM. 1994. Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *J. Biotech.* 34: 269-287.
- Huszar D, Balling R, Kothary R, Magli MC, Hozumi N, Rossant J, Bernstein A. 1985. Insertion of a bacterial gene into the mouse germ line using an infectious retrovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8587-8591.
- Hwang SW, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM et al. 2004. Evidence of a pluripotent embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science Express*.
- Iguma LT, Lisauskas SFC, Melo EO, Franco MM, Pivato I, Vianna GR, Sousa RV, Dode MAN, Aragão FJL, Rech EL, Rumpf R. 2005. Development of Bovine Embryos Reconstructed by Nuclear Transfer of Transfected and Non-Transfected Adult Fibroblast Cells. *Genetics and molecular research*: 4: 55-66
- Jahner D, Haase K, Mulligan R, Jaenisch R. 1985. Insertion of the bacterial gpt gene into the germ line of mice by retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6927-6931.
- Jimenez CR et al. 1994. *J. Neurochem.* 62:404-407.

- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A and Karatzas CN. 2001. Generation of Dwarf Goat (*Capra hircus*) Clones Following Nuclear Transfer with Transfected and Nontransfected Fetal Fibroblasts and In Vitro-Matured Oocytes. *Biol. of Reprod.* 64: 849-856.
- Keefer CL, Stice SL, Matthews DL. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol Reprod.* 50: 935–939.
- Kerr DE, Furth PA, Powell AM, Wall RJ. 1996. Expression of gene-gun injected plasmid DNA in the ovine mammary gland and in lymph nodes draining the injection site. *Animal Biotechnology* 7: 33-45.
- Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW, Moon SY. 2005. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23(9): 1228-33.
- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, Vand Der Schans A, Van Den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R & De Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using “in vitro” embryo production. *Biotechnology* 9: 844-847.
- Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JA. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering.* 56: 473-84.
- Lauria A, Gandolfi F. 1993. Recent advances in sperm cell mediated gene transfer. *Moll. Reprod. Devel.* 36: 255-257.

- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57: 717-723.
- Lee WK, Kim SJ, Lee T, Han Y, Yoo OJ, Im KS, Lee K. 1998. Expression of a bovine beta-casein/human lysozyme fusion gene in the mammary gland of transgenic mice. *Journal of Biochemical Molecular Biology* 31: 413-417.
- Leite A, Kemper EL, Silva MJ, Luchessi AD, Siloto RMP, Bonaccorsi ED, Eldorri HF, Arruda P. 2000. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding* 6 (1): 47-53.
- Li Wang, Enkui Duan, Li-ying Sung, Byeong-Seon Jeong, Xiangzhong Yang, and X Cindy Tian. 2005. Generation and Characterization of Pluripotent Stem Cells from Cloned Bovine Embryos. *Biology of Reproduction* 73: 149–155.
- Lisauskas S, Rech E, Aragão FJL. 2007. Characterization of Transgene Integration Loci in Transformed Madin Darby Bovine Kidney Cells. *Cloning and Stem Cells*. 9: 456-460.
- Lisauskas SFC, Cunha NB, Vianna GR, Mendes EA, Ramos GL, Maranhão AQ, Brígido MM, Almeida JOS, Pesquero JB, Aragão JL, Rech EL. 2008. Production of a recombinant human factor IX in milk of mice. *Biotechnology Letters*, Submitted.
- Mannik A, Piirsoo M, Nordström K, Ustav E, Vennström B, Ustav M. 2003. Effective generation of transgenic mice by Bovine papillomavirus type 1 based self-replicating plasmid that is maintained as extrachromosomal genetic element in three generations of animals. *Plasmid* 49: 193-204.

- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE & Kind AJ. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066-1069.
- Mitalipov SM, Kuo HC, Hennebold JD, Wolf DP. 2003. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol Reprod.* 69(6): 1785-92.
- Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wininger D et al. 2003. Human embryonic stem cells lines derived from discarded embryos. *Stem cells* 21: 521-526.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux V, Ivçnyi E, Markkula M, Rossant J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110: 815–821.
- Ng H-H and Bird AP. 1999. DNA Methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 9: 158–163.
- Ohe Y, Zhao D, Saijo N, Podack ER. 1995. Construction of a novel bovine papillomavirus vector without detectable transforming activity suitable for gene transfer. *Hum Gene Ther.* 6: 325-333.
- Oleskovicz C, Lisauskas S, Aragão FJL. 2004. Expression of human morphogenetic protein (BMP-2 and BMP-4) genes in transgenic bovine fibroblasts. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 56: 547-549.
- Oliveira RR, Carvalho DM, Lisauskas SFC, Melo EO, Vianna GR, Dode MAN, Rumpf R, Aragão FJL, Rech EL. 2005. Effectiveness of Liposomes to Transfect Livestock Fibroblasts.. *Genetics and Molecular Research* 4 (2): 185- 196.

- Olmsted CA. 1967. A physico-chemical study of fetal calf sera used as tissue cultured nutrient correlated with biological tests for toxicity. *Exp. Cell. Res.* 48: 283-299.
- Onions D and Lees G. 1993. The use of retroviral vector in gene therapy. An overview of vector systems and integrated biosafety testing strategy for packaging cell lines and vectors stocks. *Q-one Biotech Technical Bulletin* p. 17.
- Ouhibi N, Sullivan NF, English J, Colledge WH, Evans MJ, Clarke NJ. 1995. Initial culture behaviour of rat blastocysts on selected feeder cell lines. *Mol Reprod Dev.* 40(3): 311-24.
- P.A.L.M. 2003. Microlaser Technologies AG. Quick Software Guide MicroBeam 2.2-0103 (EN).
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. 1982. Dramatic growth of mice that developed from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Peixer MAS, Rumpf R, de Bem AR, Queiroz LMV. 1997. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas. *Trabalho apresentado na reunião anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões.*
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284: 1180-1183.



- Piedrahita JA, Anderson GB, BonDurant RH. 1990. On the isolation of embryonic stem cells: Comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology* 34: 879–901.
- Platenburg GJ, Kootwijk EP, Kooiman PM, Woloshuk SL, Nuijens JH, Krimperfort PJ. 1994. Expression of human lactoferrin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research* 3: 99-108.
- Rhind SM, Taylor JE, De Sousa PA, King TUI, McGarry M, Wilmut I. 2003. Human Cloning: can it be made safe? *Nature reviews* 4:855-864.
- Ríos G, Lossow A, Hertel B, et al. 2002. Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *Plant J.* 32: 243–253.
- Rokkones E, Fromm SHO, Kareem BN, Klungland H, Olstad OK, Hogset A. 1996. Human parathyroid hormone as a secretory peptide in milk of transgenic mice. *Journal of Cellular Biochemistry* 59: 168-176.
- Rosochacki SJ, Strzelecka M, Kozikova L, Matejczyk M, Oblap R, Poloszynowicz J, Zwierzchowski L. 2002. Expression of microinjected reporter gene lacZ during first cleavages of rabbit embryos. *Folia Biol. (Krakow)* 50(1-2): 61-7.
- Rudolph NS. 1995. Regulatory issues relating to protein production in transgenic animal milk. *Genetic Engineering News* 15: 16-18.
- Rudolph NS. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology* 17: 367-374.
- Rumpf R, Bem AR de, Peixer MAS, Sousa RV de. 2000. Manual sobre Transferência e Micromanipulação de embriões na espécie bovina. Embrapa-CENARGEN, Brasília-DF, 115p.

- Rumpf R, Bem AR de, Sousa RV, Peixer MAS. 1992. Bissecção de embriões de bovinos. In: *VII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões*, Jaboticabal. Anais. p. 92.
- Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yamamoto Y, Hirayama H, Kageyama S, Pan J, Murata T, Kobayashi Y, Obata Y, Yokoyama KK. 2003. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309: 104–113.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Sarver N, Gruss P, Law MF, Khoury G, Howley PM. 1981. Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eucariotic cloning vector. *Mol. Cell Biol.* 1: 486-496.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-2133.
- Shi-Wu Li, Nembhard KM, Prockop DJ, Khillan JS. 1996. Identification and cloning of integration site of DNA by PCR. *BioTechniques* 20: 356-358.
- Shutze K, Lahr G. 1998. Identification of expressed genes by laser mediated manipulation of single cells. *Nature Biotechnology* 16(8): 737-742.
- Simons JP, McClenaghlan M, Clark AJ. 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 328: 530-532.

- Sohn BH, Kim SJ, Park H, Lee SC, Hong HJ. 1999. Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biology* 18: 845-852.
- Stich M, Thalhammer S, Burgemeister R, Friedemann G, Ehnle S, Lüthy C, Schütze K. 2003. Live cell catapulting and recultivation. *Pathol Res Pract*. 199(6): 405-9.
- Stinnakre MG, Soulier S, Schibler L, Lepourry L, Mercier JC. 1999. Position-independent and copy-number-related expression of a goat bacterial artificial chromosome  $\alpha$ -lactalbumin gene in transgenic mice. *Biochem. J.* 339: 33-36.
- Suraokar M and Bradley A. 2000. Targeting sheep. *Nature* 405: 1004-1005.
- Thierry AR, Rabinovich P, Peng B, Mahan LC, Bryant JL, Gallo RC. 1997. Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Therapy* 4: 226-237.
- Thompson AR. 1986. Structure, function, and molecular defects of factor IX. *Blood*. 67(3):565–572.
- Tielens S, Verhasselt B, Liu J, Dhont M, Van Der Elst J, Cornelissen M. 2006. Generation of embryonic stem cell lines from mouse blastocysts developed in vivo and in vitro: relation to Oct-4 expression. *Reproduction*. 132(1): 59-66.
- Tsukui T, Kanegae Y, Saito L, Toyoda Y. 1996. Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. *Nat. Biotechnol.* 14: 982-985.

- Van Cott KE, Williams B, Velandar WH, Gwazdauskas F, Lee T, Lubon H, Drohan NW. 1996. Affinity purification of biologically active and inactive forms of recombinant human protein C produced in porcine mammary gland. *Journal of Molecular Recognition* 9: 407-414.
- van der Putten H, Botteri FM, Miller AD, Rosenfeld MG, Fan H, Evans RM, Verma IM. 1985. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6148-6152.
- Verma V, Gautam SK, Singh B, Manik RS, Palta P, Singla SK, Goswami SL, Chauhan MS. 2007. Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells from in vitro-produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Mol Reprod Dev.* 74(4): 520-9.
- Viñals F, López-Rovira T, Rosa JL et al. Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett.* 2002; 510: 99-104.
- Wall RJ. 1996. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45: 57-68.
- Wall RJ. 1999. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. *Lives Production Science* 59: 243-255.
- Wall RJ and Hawk HW. 1988. Development of centrifuged cow zygotes cultured in rabbit oviducts. *J. Reprod. Fertil.* 82: 673-680.
- Wall RJ, Pursel VG, Hammer RE and Brinster RL. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol. Reprod.* 32: 645-651.
- Wall RJ. 2001. Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* 3: 209-220.

- Watanabe M, Umeyama K, Kawano H, Izuno N, Nagashima H, Miki K. 2007. The production of a diabetic mouse using constructs encoding porcine insulin promoter-driven mutant human hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ . *J Reprod Dev* 53: 189-200.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813.
- Wolff J, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1: 363-369.
- Wright G, Colman A. 1997. Purification of recombinant proteins from sheep's milk. In: Houdbine L.M. (ed.) *Transgenic animals: Generation and Use*. (pp. 469-471). *Haward Academic Publishers, Amsterdam* 469-471.
- Wrobel I, Collins D. 1995. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1235: 296-304.
- Yanagimachi R. 2002. Cloning: experience from the mouse and other animals *Molecular and Cellular Endocrinology* 187 (1-2): 241-248.
- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. 1985. Nucleotide Sequence of the Gene for Human Factor IX (Antihemophilic Factor B). *Biochemistry* 24: 3736-3750.
- Yull F, Binas B, Harold G, Wallace R, Clark AJ. 1997. Transgene rescue in the mammary gland is associated with transcription but does not require translation of BLG transgenes. *Transgenic Research* 6: 11-17.
- Zinoveiva N, Lassing C, Schams D, Besenfelder U, Wolf E, Muller S. 1998. Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of

hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations.

*Transgenic Research* 7: 437-447.

Ziomek CA. 1996. Minimization of viral contamination in human pharmaceutical produced in the milk of transgenic goats: In: Viral safety and evaluation of viral clearance from biopharmaceutical products, edited by F. Brown and S. Lubiniecki. *Basel: Karger* 265-268.

## **ANEXOS**

## **Publicação 2**

# **Characterization of Transgene Integration *Loci* in Transformed Madin Darby Bovine Kidney Cells**

**SHARON F.C. LISAIUSKAS,<sup>1,2</sup> ELÍBIO L. RECH,<sup>1</sup> and FRANCISCO J.L. ARAGÃO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, W5 Norte, 70.770-900, Brasília , DF, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70.910-970, Brasília, DF, Brazil.

**CLONING AND STEM CELLS**  
**Volume 9, Number 4, 2007**  
**© Mary Ann Liebert, Inc.**  
**DOI: 10.1089/clo.2007.0054**



## **Publicação 3**

# **Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts**

**Raniere R. Oliveira, Daniela M. de Carvalho, Sharon Lisauskas,  
Eduardo Mello, Giovanni R. Vianna, Margot A.N. Dode,  
Rodolfo Rumpf, Francisco J.L. Aragão and Elíbio L. Rech**

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia,  
Laboratório de Transferência e Expressão de Genes,  
Parque Estação Biológica, 70770-900 Brasília, DF, Brasil  
Corresponding author: E.L. Rech  
E-mail: rech@cenargen.embrapa.br

Genet. Mol. Res. 4 (2): 185-196 (2005)  
Received December 9, 2004  
Accepted April 25, 2005  
Published June 13, 2005

## Publicação 4

# Expression of human *bone morphogenetic protein (BMP-2 and BMP-4) genes* in transgenic bovine fibroblasts

C. Oleskovicz<sup>1,2</sup>, S. Lisauskas<sup>3,4</sup>, F.J.L. Aragão<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Católica de Brasília - Campus II - Brasília, DF

<sup>2</sup> Hospital de Base - Unidade de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial - Brasília, DF

<sup>3</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia PqEB Final Av. W3 Norte 70770-900 - Brasília, DF

<sup>4</sup> Universidade de Brasília - Campus Brasília, DF

*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,  
v.56, n.4, p.547-549, 2004

Recebido para publicação em 18 de junho de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 19 de dezembro de 2003

\*Autor para correspondência.

E-mail: aragao@cenargen.embrapa.br

### Fator IX de Coagulação Humana: Código Genético e Proteína

Translation of Unknown (1-1320)

Universal code

Total amino acid number: 439, MW=49445

Max ORF: 1-1317, 439 AA, MW=49445

1 ACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAAT  
1 T V F L D H E N A N K I L N R P K R Y N

61  
TCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAG  
21 S G K L E E F V Q G N L E R E C M E E K

121  
TGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTTGG  
41 C S F E E A R E V F E N T E R T T E F W

181 AAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGC  
61 K Q Y V D G D Q C E S N P C L N G G S C

241 AAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTGAAGGAAAGAACTGT  
81 K D D I N S Y E C W C P F G F E G K N C

301  
GAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGT  
101 E L D V T C N I K N G R C E Q F C K N S

361  
GCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAG  
121 A D N K V V C S C T E G Y R L A E N Q K

421 TCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAG  
141 S C E P A V P F P C G R V S V S Q T S K

481 CTCACCCGTGCTGAGGCTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAA  
161 L T R A E A V F P D V D Y V N S T E A E

541 ACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTAAATGACTTCACTCGGGTTGTT  
181 T I L D N I T Q S T Q S F N D F T R V V

601 GGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGCCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTT  
201 G G E D A K P G Q F P W Q V V L N G K V

661 GATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCTGCCACTGT  
221 D A F C G G S I V N E K W I V T A A H C

721  
GTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTGCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAA  
241 V E T G V K I T V V A G E H N I E E T E

781  
CATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCT  
261 H T E Q K R N V I R I I P H H N Y N A A

841 ATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAAC  
281 I N K Y N H D I A L L E L D E P L V L N

901 AGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTT  
301 S Y V T P I C I A D K E Y T N I F L K F

961 GGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTT  
321 G S G Y V S G W G R V F H K G R S A L V

1021 CTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTC  
341 L Q Y L R V P L V D R A T C L R S T K F

1081 ACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAA  
361 T I Y N N M F C A G F H E G G R D S C Q

1141  
GGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATT  
381 G D S G G P H V T E V E G T S F L T G I

1201  
ATTAGTTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCC  
401 I S W G E E C A M K G K Y G I Y T K V S

1261  
CGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTCACCACCACCACCACCACTAA  
421 R Y V N W I K E K T K L T H H H H H H \*