

Fabiana Fernandes Bressan

Produção de animais transgênicos por transferência nuclear  
como modelo de estudo biológico

Pirassununga

2008

Fabiana Fernandes Bressan

Produção de animais transgênicos por transferência nuclear  
como modelo de estudo biológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Mario Binelli

Pirassununga

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2004 FMVZ	<p>Bressan, Fabiana Fernandes</p> <p>Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico / Fabiana Fernandes Bressan. – Pirassununga: F. F. Bressan, 2008.</p> <p>80 f., il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli.</p> <p>1. Transgenia. 2. Transferência nuclear. 3. Bovino. 4. GFP. I. Título.</p>
----------------	--

## **ERRATA**

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Resumo	7	3	86 f.	80 f.
Abstract	9	3	86 f.	80 f.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

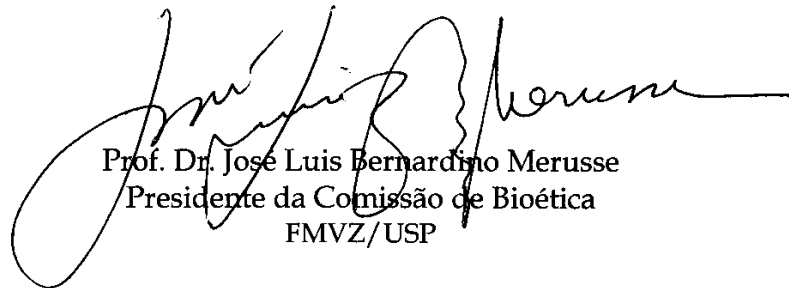
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Criação de uma biblioteca de inserção gênica aleatória no genoma de fibroblastos fetais bovinos contendo o gene codificador da proteína fluorescente verde (GFP) e possível método para o estabelecimento de um modelo de animais auto-sexáveis", protocolado sob o nº908/2006, utilizando, aproximadamente 60 (sessenta) ovários por rotina (10 rotinas) sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Binelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/06/06".

(We certify that the Research "Creation of a random genetic insertion library using the bovine fetal fibroblast genome expressing the green fluorescent protein (GFP) gene and a possible method for the establishment of an auto-sexing animal model", protocol number 908/2006, under the responsibility of Prof. Dr. Mario Binelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 06/14/2006).

São Paulo, 19 de junho de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do Autor: BRESSAN, Fabiana Fernandes

Título: Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

À minha mãe, Nadir Fernandes Bressan.  
Minha mãe, amiga, meu exemplo de força,  
luta e determinação. As minhas vitórias  
serão sempre suas também.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho. Agradeço também àqueles que talvez não trabalharam diretamente nestes experimentos, mas que me proporcionaram momentos importantes de convivência, e que me fizeram perceber que a pós-graduação não é somente um momento de realizações científicas, mas também de construção pessoal.

Agradeço ao Prof. Flávio Meirelles por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Agradeço a confiança, os ensinamentos, as oportunidades. E também pela construção de um pensamento científico, profissional e pessoal sólido.

Ao Prof. Mario Binelli, agradeço também pela confiança depositada em mim desde minha iniciação científica em seu laboratório. Espero que seu pensamento científico, assim como sua amizade, estejam comigo sempre, e para sempre.

Em especial, agradeço ao amigo Moyses Miranda. Não somente pela convivência e discussões científicas, mas também pelo trabalho neste projeto. Este estudo é tão meu quanto seu.

Agradeço ao Prof. Dr. Bryan Strauss, Prof. Dr. José Eduardo Krieger e Dr. Marcio Bajgelman, do INCOR, FMUSP, por me deixarem entrar em seus laboratórios e realizar as etapas iniciais deste projeto.

Agradeço à Prof. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante e à amiga Daiane pela recepção no Hemocentro de Ribeirão Preto e pelos ensinamentos imprescindíveis na etapa final deste estudo.

Aos amigos do LMMD, Histologia e agregados, Tiago, Pedrinho, Lígia, Sylvia, Paulo, Felipe, Chris, Marcos, Birita, Raquel, Juliano, Giovana, Peninha, Nilton, entre muitos outros que já passaram por lá e fizeram história.

À Profa. Dra. Flavia Verechia, pela amizade e colaboração direta neste projeto, que o tornou extremamente agradável de ser realizado.



Aos amigos do VRA de Pirassununga e de São Paulo, e aos amigos da casa do Nappama, nosso cantinho, agradeço por tanto tempo de convivência harmoniosa, de conversas sérias e de outras nem tão sérias assim.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em especial ao Departamento de Reprodução Animal, pela possibilidade da execução desta dissertação. À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Ciências Básicas, por me fazer sentir “em casa”.

Ao CNPQ e à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

BRESSAN, F. F. **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico.** [Production of transgenic bovine by nuclear transfer: model for biological studies]. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

A produção de animais transgênicos possui aplicações que envolvem desde a pesquisa básica à produção agropecuária. O recente progresso na clonagem animal por transferência nuclear (TN) possibilitou a produção de animais transgênicos utilizando linhagens de células doadoras de núcleo previamente modificadas geneticamente. A possibilidade de manipulação genética, estudo da expressão gênica e adequada seleção da célula doadora de núcleo na TN não somente pode garantir a presença da construção gênica em toda a prole, como também pode evitar a produção de animais portadores de modificações indesejáveis resultantes da inserção do inserto em regiões codificantes do genoma, em decorrência da inserção aleatória das técnicas de transferência gênica mais comuns. Este trabalho teve como objetivo geral produzir animais transgênicos a partir de transferência nuclear utilizando como células doadoras de núcleo fibroblastos modificados geneticamente por transdução lentiviral. Objetivos específicos foram a produção e caracterização de linhagens de fibroblasto fetal portadores do gene da Proteína Fluorescente Verde (eGFP) quanto à seleção da expressão do transgene, passagem celular e posição da inserção do transgene e sua utilização na técnica de transferência de núcleos para a análise da competência de desenvolvimento a blastocisto e estabelecimento de gestações. Para tal, fibroblastos fetais bovinos foram transduzidos pelo sistema lentiviral. Células expressando o gene da eGFP foram selecionadas por citometria de fluxo e utilizadas como doadoras de núcleo na TN. Foram analisados o efeito do período de cultivo dos fibroblastos, assim como o efeito da recloneagem na competência de desenvolvimento a blastocisto e estabelecimento de gestações. O cultivo celular submetido à recloneagem foi analisado quanto à posição de inserção do transgene, sendo constatado nos fetos produzidos neste experimento a presença de uma inserção única em região não transcrita do cromossomo 14. Não houve efeito neste experimento do tempo de cultivo na competência de desenvolvimento a blastocisto, mas houve efeito benéfico da recloneagem celular. Além disso, foram obtidos 4 fetos, sendo 3 transgênicos, dos embriões transferidos provenientes das TNs que utilizaram células transgênicas de inserção aleatória em baixas e altas passagens e 6 fetos dos 37 embriões transferidos provenientes das TN que utilizaram células recloneadas,

sendo todos transgênicos. Conclui-se que a produção de células transgênicas mediante mecanismo de transdução lentiviral, pode resultar, após TNCS, em embriões geneticamente idênticos à células doadora capazes de sustentar o desenvolvimento *in vitro* a blastocisto e o estabelecimento de gestações. Finalmente, são discutidos fatores ligados ao processo de seleção e recloneagem que aumentam a eficiência da produção de gestações por TNCS.

Palavras-chave: Transgenia. Transferência nuclear. Bovino. GFP.

## ABSTRACT

BRESSAN, F. F. **Production of transgenic bovine by nuclear transfer: model for biological studies.** [Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico]. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Genetically modified animals have numerous applications ranging from basic research to agriculture production. Recent progress in animal cloning by nuclear transfer (NT) has made possible the production of transgenic animals using previously genetically modified cell lineages. The possibility of genetic manipulation, gene expression studies and adequate selection of the nuclei donor cell for NT not only can guarantee the presence of the gene construction in the offspring, but also can avoid the production of animals that carries undesirable characteristics, often as a result of the random insertion of transgenes in transcribed areas of the genome. General objective of this study was to produce transgenic animals by nuclear transfer using lentivirus-genetically modified nuclei donor fibroblasts. Specifically, objectives were the production and characterization of fetal fibroblasts lineages expressing eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*, eGFP) gene in different cell passages regarding transgene insertion position and its use for the nuclear transfer procedure. The potential of blastocyst development and pregnancy establishment were analyzed in embryos reconstructed with late and early passages and with clonal or random insertion of transgenes (recloning). For that, bovine fetal fibroblasts were transduced with lentiviruses. eGFP expressing cells were selected by flow cytometry sorting and used as nuclei donor cells for NT. Transgene integration site of the cell culture submitted to recloning was analysed. It was observed that a unique insertion in a non-transcribed area of chromosome 14 was present in the fetuses recovered in this recloning experiment. No effect of culture time on development of blastocysts was observed, however, there was a beneficial effect of the cell recloning. Besides, 4 fetuses (3 of them were transgenic) were obtained when 64 embryos reconstructed with random transgene position cells in late and early passages were transferred and 6 fetuses were obtained when 37 embryos reconstructed with recloned cells were transferred (all of them were transgenic). In conclusion, lentivirus transduction was able to produce transgenic cells with a stable expression of the transgene. These cells, when used for SCNT, can be reprogrammed and genetically identical embryos able to sustain *in vitro* culture, pregnancy

establishment and recognition. Finally, recloning and cell selection procedures are discussed as a possible approach to increase pregnancy efficiency after TNCS.

Key words: Transgenesis. Nuclear transfer. Bovine. GFP.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. HIPÓTESES</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1 Transferência nuclear.....	20
3.2 Técnica de transferência de genes.....	24
3.3 Seleção da célula doadora de núcleo para a TNCS.....	25
3.4 Produção de animais transgênicos por TNCS.....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>32</b>
4.1 Fluxograma das atividades.....	32
4.2 Obtenção das células transgênicas .....	33
4.3 Seleção das células por citometria de fluxo.....	35
4.4 Caracterização das populações celulares com inserções aleatórias ou clonais.....	35
4.5 Extração de DNA genômico .....	36
4.6 Microscopia de fluorescência .....	36
4.7 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	36
<b>4.8 Reação da Polimerase em cadeia mediada por ligação (<i>Ligation-mediated PCR, LM-PCR</i>)</b> .....	<b>38</b>
4.9 Produção de animais transgênicos através da transferência nuclear.....	40
4.9.1 Preparo das células doadoras de núcleo .....	41
4.9.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	41
4.9.3 Enucleação e reconstrução oocitária .....	42
4.9.4 Ativação dos oócitos reconstruídos.....	43
4.9.5 Produção de embriões partenogênicos .....	43
4.9.6 Cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....	43

4.10	Transferência de embriões .....	44
4.11	Diagnóstico de gestação.....	44
4.12	Confirmação da presença do transgene nos produtos de gestação .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Produção das células transgênicas .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Clonagem celular por citometria de fluxo .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>Confirmação da presença do inserto nas colônias: reação da polimerase em cadeia</b>	<b>51</b>
<b>5.4</b>	<b>Identificação da posição de inserção do transgene no genoma celular: PCR mediada por ligação (ligation-mediated PCR ou LM PCR) .....</b>	<b>51</b>
<b>5.5</b>	<b>Produção de animais transgênicos por transferência nuclear: análise da viabilidade embrionária e da taxa de gestação. ....</b>	<b>52</b>
5.5.1	Produção de animais transgênicos utilizando como células doadoras de núcleo fibroblastos fetais com diferentes períodos em cultivo .....	54
5.5.2	Produção de animais transgênicos utilizando como células doadoras de núcleo: reclonagem da célula doadora de núcleo.....	55
<b>5.6</b>	<b>Confirmação da presença do inserto nos fetos:.....</b>	<b>56</b>
5.6.1	Reação da polimerase em cadeia .....	57
5.6.2	Análise da expressão da eGFP .....	57
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>





## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia transgênica ocupa um papel de destaque nos avanços da biotecnologia. A possibilidade de manipulação genética *in vitro* de organismos revolucionou o entendimento sobre processos biológicos e moleculares, abrindo uma grande oportunidade de praticar a ciência de um modo antes não imaginável. A adição ou a inativação de genes de interesse em plantas ou em animais resulta em inúmeras aplicações na biomedicina, na biologia molecular e na agropecuária. Via de regra, as aplicações, como a produção de produtos farmacológicos, a produção de modelos para estudos de doenças animais ou humanas, a melhoria de características de produção animal, o estudo da regulação e expressão gênica, entre muitas outras, são diretamente ou indiretamente relacionadas ao bem estar do Homem (JAENISCH et al., 1988; HOUDEBINE et al., 2005).

Os primeiros sucessos na tecnologia de transferência de genes em modelos animais datam do começo da década de 80. Brinster et al., em 1980, após microinjeção intracitoplasmática, observou que o zigoto murino traduziu tanto o RNA mensageiro (RNAm) de globina de coelho quanto de camundongo. Gordon e Ruddle, em 1981, desenvolvendo a técnica de microinjeção pronuclear em zigotos, introduziram o termo “transgênico” pela primeira vez, produzindo camundongos geneticamente modificados pela introdução de DNA exógeno em embriões em fases iniciais do desenvolvimento. Atualmente, o termo transgenia é considerado como a introdução de uma ou mais seqüências de DNA exógeno no genoma de organismos pluricelulares capazes de serem expressas mediante a formação de uma proteína funcional, modificação esta transmitida à progênie da espécie manipulada.

Outro importante marco na transgênese animal foi a introdução do gene do hormônio de crescimento de rato e do promotor da metalotioneína do camundongo em zigotos de rato, através da microinjeção, em 1982 (PALMITER et al., 1982), quando pela primeira vez provou-se que o animal transgênico pode produzir grandes quantidades de determinada proteína e assim, tornar-se um biorreator. A partir de então, muitas outras tecnologias foram desenvolvidas para a transferência de genes de interesse em animais. A primeira espécie

---

animal de produção transgênica foi produzida somente alguns anos após, em 1985, também via microinjeção de DNA exógeno em pronúcleos de zigotos ovinos e suínos, além de coelhos (HAMMER et al., 1985).

Muitos são os métodos utilizados na manipulação genética de organismos: microinjeção pronuclear de DNA exógeno em zigotos (GORDON et al., 1981; HAMMER et al., 1985), transferência de DNA mediada por espermatozóide durante a fertilização *in vitro* (GANDOLFI et al., 1998), transferência de DNA para células ou embriões mediada por lipossomos, eletroporação de DNA em espermatozoides, zigotos ou embriões, injeção de células embrionárias previamente modificadas em blastocelos e a transferência nuclear de células somáticas ou embrionárias também previamente geneticamente modificadas (SCHNIEKE et al., 1997; CIBELLI et al., 1998, WHEELER 2003). O principal fator limitante de todas as técnicas é a baixa eficiência, tornando-as caras e laboriosas. A microinjeção, por exemplo, a mais comum das metodologias, produz aproximadamente 2% de camundongos transgênicos (PALMITER et al., 1982; MONTOLIU et al., 2004), 0,1 a 0,5% de suínos (NAGASHIMA et al., 2003), 0,01 a 0,1% de cabras e ovelhas (BALDASSARRE et al., 2003; KEEFER, 2004) e um número ainda menor de bovinos. Estas técnicas também já demonstraram que a inserção do transgene no genoma hospedeiro é predominantemente aleatória (CLARK et al., 2000), o que torna a expressão transgênica, quando presente, de regulação imprevisível. Tal fato é importante por que a expressão de um transgene é influenciada pela sua localização no DNA genômico, ou seja, seu posicionamento em relação a elementos de controle transcricional, regiões de heterocromatinas não-transcritas dos cromossomos, além de outras regiões silenciadas. Também, como desvantagem da inserção aleatória, a integração pode causar um efeito knock-out não intencionado (RULICKE, 2000; WILLIAMS, 2008). A área de DNA genômico próxima à região de integração do inserto pode ter, frequentemente, sua expressão alterada, uma vez que podem ocorrer várias formas de duplicação, deleção ou rearranjo da seqüência como consequência da incorporação do transgene. As mudanças fenotípicas resultantes podem ser cruciais para o bem-estar animal ou mesmo para a criação e manutenção de linhagens transgênicas (RULICKE, 2000; DUNN et al., 2005).

Um exemplo deste fenômeno foi relatado por Punzon et al., em 2004, que detectaram a variabilidade da secreção do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos

(*granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF*) em camundongos transgênicos era independente do número de cópias e pode ter sido resultante de um efeito de posição do inserto, levando à ativação de mecanismos de silenciamento. O mesmo efeito também foi achado por Hofmann et al., em 2006, que encontraram que o sítio de integração do transgene pode severamente afetar a expressão do gene codificador da Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein, GFP*), um conhecido gene repórter.

Muitos estudos ainda são necessários para o entendimento e relacionamento entre o padrão e o nível de expressão de uma construção introduzida em uma determinada célula e sua localização cromossomal. Felizmente, metodologias vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar o entendimento e sucesso nesta área. A técnica de transferência nuclear (TN), aliada à eficiente modificação genética da célula doadora de núcleo apresenta vantagens importantes quando comparada a outras técnicas, incluindo a bem caracterizada injeção pronuclear.

Este trabalho teve como **objetivo geral** produzir animais transgênicos a partir de transferência nuclear utilizando como célula doadora de núcleo fibroblastos modificados geneticamente por transdução lentiviral. **Objetivos específicos** foram a produção e caracterização de linhagens de fibroblastos fetais portadores do gene da Proteína Fluorescente Verde (eGFP) quanto à seleção da expressão do transgene, passagem celular e posição da inserção do transgene e sua utilização na técnica de transferência de núcleos para a análise da competência de desenvolvimento a blastócito e estabelecimento de gestações.

HIPÓTESES

---

## 2 HIPÓTESES

A introdução do gene da eGFP em fibroblastos fetais bovinos via ação lentiviral permite a criação de linhagens celulares expressando a eGFP de maneira estável.

As células produzidas e selecionadas pela expressão do eGFP resultam em produção de embriões e fetos transgênicos por TNCS.

Os procedimentos de seleção e cultivo celular interferem nas taxas de desenvolvimento de embriões transgênicos produzidos por TNCS

REVISÃO DE LITERATURA

---

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

Esta revisão tem como objetivo apresentar opções metodológicas para a produção de animais geneticamente modificados, que permitem superar os desafios e aumentar os índices de sucesso da técnica. Discute-se em particular a viabilidade da utilização da transferência nuclear de célula somática (TNCS) como método de escolha para o procedimento. Serão abordados os conceitos de transferência nuclear, tecnologia de transferência de genes, a seleção da célula doadora de núcleo para a TN e a aplicabilidade de animais transgênicos produzidos por transferência nuclear.

#### **3.1 Transferência nuclear**

A TN consiste na fusão de uma célula (célula doadora de núcleo) com um oócito enucleado (citoplasto receptor) e na ativação deste conjunto. Havendo sucesso, o núcleo celular será reprogramado e dará início ao desenvolvimento embrionário. Cada embrião assim reconstruído será geneticamente idêntico à célula doadora de núcleo.

A produção de animais transgênicos a partir de células modificadas geneticamente permitiu grandes avanços técnicos na produção de animais transgênicos. O DNA exógeno pode ser incorporado no genoma estudado e a inserção e expressão do transgene verificada antes da utilização destas células na produção animal.

Os primeiros experimentos de transferência nuclear em mamíferos, tanto de laboratório quanto de produção, foram realizados utilizando células embrionárias não modificadas como células doadoras de núcleo. Respectivamente, Illmensee e Hoppe, em 1981, em camundongos, e Willadsen, em 1986, em ovinos, assim como outros grupos de

pesquisa da época acreditavam na pluripotencialidade das células embrionárias para o sucesso da reprogramação nuclear e desenvolvimento dos demais tipos celulares de um organismo.

Células-tronco embrionárias são linhagens obtidas de embriões nos estágios iniciais de mórula ou blastocisto. Tais células são capazes de participar da formação de todos os tecidos, incluindo gametas. O DNA exógeno pode ser incorporado nestas células, que após seleção, são introduzidas em oócitos enucleados ou mesmo em embriões em estágio pré-implantacional. Quando introduzidas em embriões, uma determinada proporção das células-tronco tornam-se parte deste embrião. Uma vez que os embriões são transferidos para fêmeas receptoras, os indivíduos originados podem se tornar quimeras, ou seja, portadores de células geneticamente modificadas em somente alguns de seus tecidos (VOSS et al., 1997; BRADLEY et al., 1984). Em camundongos, células-tronco embrionárias são uma boa alternativa a outras técnicas de produção de animais geneticamente modificados, pois não só permitem a correta modificação genética por meio de seleção, mas também possibilita que, uma vez que algumas das células germinativas contenham o transgene, o DNA exógeno possa ser transmitido para a progênie por herança mendeliana por reprodução sexuada. Porém, células-tronco embrionárias pluripotentes ainda não foram completamente caracterizadas em animais de produção (MUNOZ et al., 2008). A utilização de células “semelhantes às células-tronco” (*stem cell-like*), que são células epitelióides que se assemelham aos cultivos de células-tronco e que guardam certa pluripotência, não permitiu até o momento a transmissão da modificação genética à prole (NOTARIANNI et al., 1997; WHEELER 1994, SCHNIEKE et al., 1997). De fato, esta é a principal limitação da utilização de células-tronco embrionárias na produção de animais de produção transgênicos.

A utilização de células somáticas na produção de animais transgênicos oferece grande flexibilidade aos pesquisadores. Células somáticas tanto de animais de produção, de laboratório, ou mesmo de animais silvestres e de companhia são facilmente manipuladas e cultivadas *in vitro*, provendo um amplo estoque de material genético desejado. Utilizando a clonagem de células somáticas, a produção de ovelhas transgênicas foi 2,5 vezes mais eficiente do que se usando microinjeção (HOUDEBINE, 2000). Esse método também permite que pesquisadores estudem o transgene integrado e mantenham as células somáticas geneticamente modificadas congeladas até a clonagem.



Wilmot et al. (1997) reportaram o nascimento da ovelha *Dolly*, o primeiro mamífero clonado a partir de células somáticas adultas cultivadas em laboratório. Este estudo, na verdade, teve como objetivo principal o estabelecimento de uma metodologia eficaz para a produção de animais de produção transgênicos. (PANNO, 2005) e de fato essa técnica foi logo implementada para obtenção de ovelhas transgênicas. Mais recentemente, uma variedade de células somáticas geneticamente modificadas permitiu a produção de animais transgênicos após transferência nuclear: fibroblastos fetais (CAMPBELL et al., 1996), células do cumulus (WAKAYAMA et al., 1998), células musculares (SHIGA et al., 1999) e células epiteliais mamárias (ZAKHARTCHENKO et al., 1999), entre muitas outras.

Logo após o nascimento da ovelha *Dolly* (WILMUT et al., 1997), a TNCS foi utilizada sem grandes modificações e com sucesso na produção de várias espécies de animais de produção transgênicos (SCHNIEKE et al., 1997; CIBELLI et al., 1998), promovendo um aumento substancial na proporção de animais vivos transgênicos (POLEJAEVA e CAMPBELL, 2000; KUROIWA et al., 2002).

As etapas do procedimento de transferência nuclear estão sumarizadas na figura 1. O cultivo e seleção de células doadoras de núcleo é particularmente importante para o sucesso da técnica, como será discutido nesta revisão. Oócitos são obtidos através da aspiração de ovários, provenientes de abatedouros ou de fêmeas selecionadas. Oócitos são maturados *in vitro* e selecionados quanto à extrusão do 1º corpúsculo polar para a confirmação da maturação. A enucleação destes oócitos é feita pela retirada do material genético por aspiração com micropipetas. A introdução da célula geneticamente modificadas no espaço perivitelínico do oócito também é realizada através do sistema de micromanipulação. Os complexos célula-ooplasto são submetidos a pulsos elétricos, para que ocorra a fusão das membranas celulares, e posteriormente à ativação química dos conjuntos. Havendo sucesso em todas as etapas, o material genético da célula será reprogramado e o desenvolvimento embrionário será iniciado. O cultivo *in vitro* destes embriões é realizado por sete dias, quando então os embriões que alcançaram o estágio de blastocisto são transferidos para fêmeas receptoras para estabelecimento da gestação, ou então, são direcionados a estudos específicos.

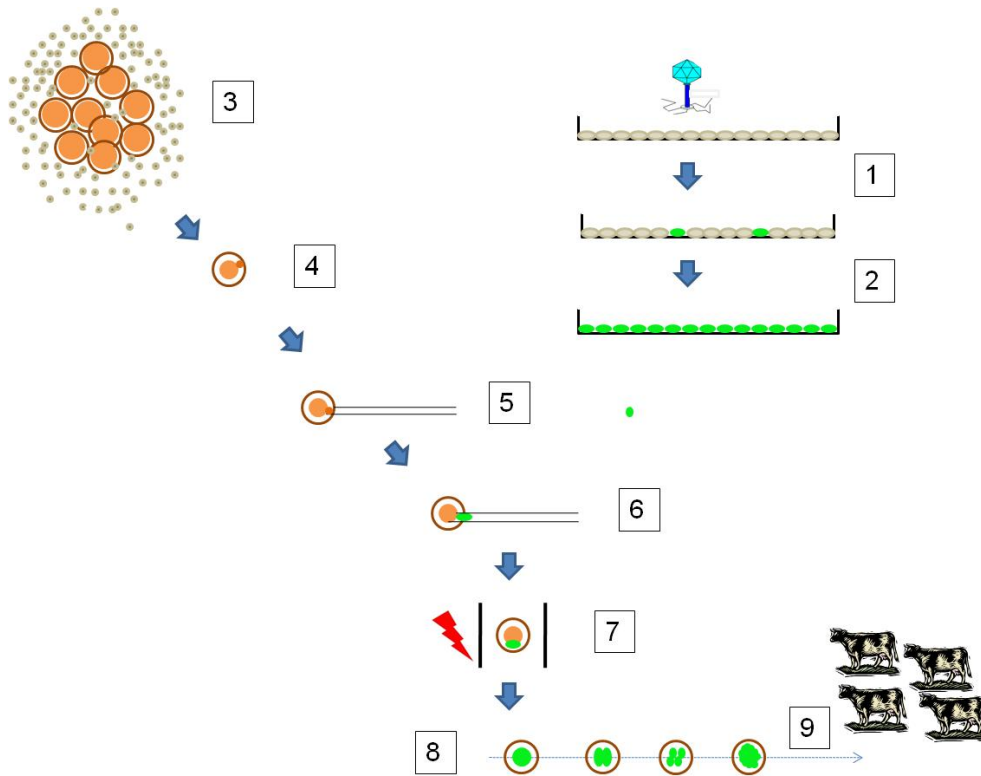


Figura 1: Esquema representativo das etapas da transferência nuclear utilizando células somáticas transgênicas como doadoras de núcleo. (1) transdução lentiviral. (2) seleção das células que expressam o transgene. (3) Maturação *in vitro* de oócitos. (4) Seleção dos oócitos que extruíram o 1º corpúsculo polar. (5) Enucleação do oócito: retirada da placa metafásica. (6) Introdução de uma células transgênica no espaço perivitelínico do citoplasto receptor. (7) Eletrofusão das membranas. (8) Ativação química dos complexos. (9) Cultivo *in vitro* dos embriões e inovação em fêmeas receptoras

### 3.2 Técnica de transferência de genes

Uma das grandes vantagens da técnica de transferência nuclear na produção de animais transgênicos, e talvez a mais importante, é a possibilidade da manipulação genética das células que servirão como doadoras de núcleo, produzindo animais geneticamente idênticos à célula selecionada. A modificação genética destas células pode ser obtida aplicando-se diversas metodologias, sendo as mais comuns a transfecção de DNA exógeno por lipossomas, por eletroporação e a transdução por vetores virais.

Lipossomas consistem em camadas de lipídeo semelhantes a lipídeos de membrana. São compostos catiônicos capazes de interagir espontaneamente com moléculas de DNA, formando complexos lipídeo-DNA. A introdução do DNA nas células ocorre através da fusão do complexo lipídeo-DNA com as membranas celulares. A técnica é simples, porém, os resultados são bastantes variáveis. Dependentes de diversos fatores, obtém-se zero a aproximadamente 50% das células expressando o transgene (OLIVEIRA et al., 2005) porém, a maior parte desta expressão é transiente, ou seja, o DNA transcrito não é integrado no material genético celular. Para que ocorra esta integração, é necessário que, em condições propícias, parte deste DNA chegue espontaneamente ao núcleo. Uma série de fatores prejudica a eficiência da técnica, como o tamanho e carga elétrica do DNA exógeno e diversas barreiras enzimáticas e de membranas (FELGNER et al., 1987) resultando na baixa eficiência da técnica (MELO et al., 2005)

Na eletroporação, o DNA de interesse é incubado em solução com as células-alvo. A solução é submetida a um pulso elétrico de curta duração e alta voltagem, o que provoca desestabilização e a abertura de poros nas membranas celulares, permitindo a entrada do DNA. Como na lipofecção, o DNA precisa atingir o núcleo para que haja a possibilidade de integração estável ao genoma. Desvantagens são, além daquelas também mencionadas para a lipofecção, a possível formação de animais mosaicos e não transgênicos.

Avanços recentes nos sistemas retrovirais de tecnologia de transferência gênica possibilitaram a perspectiva da terapia gênica e do estabelecimento de modelos transgênicos

animais (YANG, 2007). Os lentivírus pertencem à vasta família dos retrovírus, que possuem uma alta capacidade intrínseca de integração ao genoma. Os retrovírus são considerados veículos naturais de transferência de material genético ao genoma de células de mamíferos (LINNEY et al., 1999; HOUEBINE 2002). Por meio de uma inserção aleatória da construção de interesse no genoma hospedeiro, os retrovírus possuem o potencial de promover uma transdução eficiente, estável e duradoura em uma grande variedade de tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (GROPP et al., 2003; HOFFMAN et al., 2003). Além disso, em relação aos outros vírus componentes da família dos retrovírus, os lentivírus apresentam vantagens. Podem inserir genes específicos em cromossomos de células-alvo em divisão ou não, pois seu complexo pré-integração é transportado ativamente para dentro do núcleo (NALDINI et al., 1996; FOLLENZI et al., 2000). Finalmente, o “silenciamento” de genes inseridos ainda não foi observado quando lentivírus foram utilizados na transgênese (LOIS et al., 2002; IKAWA et al., 2003, GROPP et al., 2003). Além disso, a utilização de um sistema de transdução em células *in vitro* torna possível a avaliação da natureza de promotores tecido-específicos antes da aplicação destes em estratégias de terapia gênica (LOIS et al., 2002).

Diversos animais transgênicos já foram produzidos utilizando-se o sistema lentiviral, como por exemplo, ratos (MICHALKIEWICKS et al., 2007), camundongos (LOIS et al., 2002), bovinos (HOFMANN et al., 2004), suínos (HOFMANN et al., 2003) e aves (MCGREW et al., 2004). Em particular, o sistema lentiviral é especialmente interessante para a transgenia de animais de produção, por não apresentar algumas desvantagens reportadas em outras técnicas, como por exemplo, a microinjeção pronuclear.

### **3.3 Seleção da célula doadora de núcleo para a TNCS**

Grande parte do sucesso tanto da clonagem quanto da transgenia se deve à etapa de cultivo e seleção da célula doadora de núcleo. Campbell et al. (2007), sugeriram que a

indução da célula doadora de núcleo a sair da fase de crescimento causa mudanças na estrutura de sua cromatina que facilita a reprogramação da expressão gênica. A fase G0 do ciclo celular, portanto, é ideal para a clonagem, pela estrutura da cromatina ser propícia e pela célula ser diplóide. Tal indução pode ser realizada rotineiramente em laboratório através da privação de soro no cultivo celular ou pela confluência celular (CAMPBELL et al., 1996; WILMUT et al., 1997).

As principais vantagens da TNCS são decorrentes da possibilidade do cultivo *in vitro* de células doadoras de núcleo. Esta característica permite a quantificação, posicionamento genômico e a confirmação da expressão do transgene (LISAUSKAS et al., 2007), possibilitando o estabelecendo de linhagens de interesse, eventualmente levando ao nascimento de proles exclusivamente portadoras da modificação genética.

Neste contexto, a utilização de genes repórteres torna-se imprescindível no processo de produção de animais transgênicos, por permitir a seleção das células que expressam a inserção gênica.

Genes de resistência a antibióticos como neomicina, ampicilina e puromicina, como exemplos, são geralmente usados como genes repórteres por permitirem a seleção celular em cultivo (PARK, 2007). Com a adição de concentrações elevadas do antibiótico específico no cultivo, espera-se que somente as células que receberam o transgene contendo o gene de resistência ao antibiótico sejam capazes de manter a viabilidade durante diversas passagens.

O processo de introdução de DNA exógeno e seleção celular por antibióticos demanda, além do tratamento com alta concentração de antibióticos, um período de cultivo prolongado para a seleção. Tal procedimento pode ser prejudicial à capacidade da célula em cultivo de completar a mitose, aumentando a frequência de células apresentando condensação da cromatina, e organização anormal do fuso mitótico (KATO et al., 1998; COLLAS et al., 1992). Estas alterações dificultam o desenvolvimento de protocolos de sincronização do ciclo celular utilizados na TNCS, causando alterações na ploidia e no posterior desenvolvimento embrionário (CAMPBELL et al., 1996; BORDIGNON et al., 2003).

Alternativas à utilização de genes de resistência a antibióticos foram mais recentemente desenvolvido. O uso de genes que codificam proteínas fluorescentes é uma

alternativa que diminui o tempo das células em cultivo em comparação à utilização dos genes de resistência a antibióticos. Marcadores fluorescentes podem ser utilizados em diversos protocolos que visam o estudo dos processos iniciais de desenvolvimento embrionário, da ativação genômica e reprogramação epigenética (HABERMANN et al., 2007). Quando fusionados a genes codificantes de proteínas funcionais, servem para o estudo de sua localização intracelular em células, tecidos e organismos vivos. Um exemplo da utilização de genes reporteres é o modelo bovino para a monitoração quantitativa da reativação transcricional do gene *POU5F1* em embriões bovinos clonados (HABERMANN et al., 2007).

Genes codificadores para proteínas fluorescentes, como a GFP, ou então, eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), para a Proteína Fluorescente Amarela (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP), a azul (*Cyan Fluorescent Protein*, CFP) e a Vermelha (*Discosoma Red Fluorecent Protein*, DsRed), entre outras, são bastante utilizadas com este propósito. O gene da eGFP, por exemplo é utilizado comumente em estudos que objetivam analisar padrão de expressão gênica em um organismo, seja este célula, embrião ou animal (CHALFIE et al., 1994; FUNAHASHI et al., 2001; BORDIGNON et al., 2003; BHUIYAN et al., 2004; HOFMANN et al., 2004). A GFP tem sido amplamente utilizada como um excelente marcador de seleção para embriões clonados modificados geneticamente por oferecer a vantagem da confirmação visual simples da expressão gênica, através da excitação de luz no comprimento de onda de 470nm, sem o comprometimento da viabilidade embrionária (ROH et al., 2000; KOO et al., 2001; LAI et al., 2002; HYUN et al., 2003).

Com a escolha das células doadoras de núcleo apropriadas, características como o sexo ou mesmo a genética animal podem ser pré-determinadas. Deste modo, as células doadoras podem ser manipuladas em cultivo para o controle da expressão de um gene específico e/ou deletar a função de um gene em particular. As células selecionadas podem ser expandidas e estocadas para aplicações posteriores.

### 3.4 Produção de animais transgênicos por TNCS

Apesar dos muitos avanços técnicos, a TN ainda apresenta baixa eficiência. Os resultados de obtenção de gestações a termo a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, próximos a 5%. Além disso, ocorrem com alta frequência alterações na formação da placenta que resultam em altas taxas de morte embrionária e fetal, abortos ou animais portadores de dificuldades de adaptação à vida pós-natal (CIBELLI et al., 1998; HILL et al., 1999; WELLS et al., 1999; KUES AND NIEMANN, 2004). Demonstrou-se em uma série de estudos que a adequada seleção da célula doadora de núcleo pode garantir que a totalidade dos animais nascidos será transgênica, como discutido anteriormente. Progênie de 15 espécies animais (OBACK e WELLS, 2007); já foram obtidas com a TN de células adultas, fetais ou embrionárias, como por exemplo ovinos (CAMPBELL et al., 1996), bovinos (KATO et al., 1998), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), caprinos (BAGUISI et al., 1999), suínos (POLEJAVA et al., 2000), gatos (SHIN et al., 2002), coelhos (CHESNE et al., 2002); ratos (ZHOU et al., 2003), eqüinos (GALLI et al., 2003), cervídeos (BURKE, 2005), cães (LEE et al., 2005) e furões (LI et al., 2006), garantindo a eficácia da produção animal.

Ovinos portadores do gene codificante para o fator IX de coagulação humano foram os primeiros animais a serem produzidos pela TN (SCHNIEKE et al., 1997). Logo em seguida, bovinos portadores de um gene repórter de resistência a antibiótico foram produzidos com sucesso (CIBELLI et al., 1998). Desde então, a transferência de núcleo vem sendo a técnica mais utilizada para a produção de bovinos transgênicos (HOUDEBINE, 2000).

Uma das aplicações mais almeçadas da tecnologia de transferência de genes é a produção de animais biorreatores. No começo da década de 80, proteínas humanas começaram a ser produzidas em bactérias recombinantes (HOUDEBINE, 2005). Tal metodologia, porém, é limitada por não permitir modificações pós-traducionais adequadas para a produção de certas proteínas.

A produção de proteínas recombinantes em células mamíferas, por sua vez, promove um adequado enovelamento de proteína, assim como as adequadas e modificações pós-traducionais, incluindo glicosilações (MAKRIDES, 1999).

Ainda na década de 80, percebeu-se que o leite seria um dos melhores sistemas animais para a produção de proteínas em escala industrial a um custo relativamente baixo. Simons et al. (1987) obtiveram sucesso na produção de proteína ativadora de plasminogênio tecidual (*tissue plasminogen activator* – TPA) humana ativa e B-lactoglobulina ovina no leite de camundongos.

A evolução foi grande desde então. Hoje há diversos animais de produção biorreatores nascidos, e muitos deles foram produzidos por TN. Ovelhas e suínos cujos genes da alfa-1-3-galactosiltransferase (responsável pela rejeição aguda a transplantes) e da proteína priônica PrP, responsável pela doença da “vaca louca” ou encefalite espongiforme, foram removidos do genoma (DENNING et al., 2001), ovelhas expressando o fator IX de coagulação (SCHIENEKE et al., 1998), suínos com a remoção do gene da rejeição aguda, visando à utilização de órgãos para xenotransplantes, (DAI et al., 2002), bovinos expressando o hormônio de crescimento humano (SALAMONE et al., 2006), bovinos expressando altos níveis de  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína no leite visando o melhor rendimento na produção de queijo (BROPHY et al., 2003), suínos expressando elevados níveis de ômega-3 na carne (LAI et al., 2006), entre outros. Todos estes exemplos foram produzidos através da TN utilizando células geneticamente modificadas por transfecção plasmideal. Uma vez que experimentos mais atuais com a transdução celular com vetores lentivirais estão resultando em uma eficiência maior, o tempo necessário para a seleção da célula de interesse pode ser reduzido, como descrito em experimentos com caprinos (GOLDING et al., 2006) e em bovinos (HOFMANN et al., 2004).

De benefício incontestável à humanidade, a produção de proteínas terapêuticas de animais biorreatores é bem estabelecida e os primeiros produtos já estão na fase final de aprovação e prestes a ganhar o mercado (HUNTER, 2005). Uma grande variedade de proteínas humanas, totalizando um número aproximado de 100, tem sido expressa no leite de diversas espécies animais, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos e coelhos transgênicos. A antitrombina III humana, produzida em cabras, já foi testada e aprovada como medicamento



em agosto de 2006 pela Agência Européia de Medicamentos (European Medicines Agency, EMEA). Outros exemplos de importantes proteínas recombinantes sendo produzidas são: fator de crescimento semelhante à insulina 1 em coelhos, a anti-tripsina 1 em ovelhas,  $\alpha$ -lactalbumina em vacas, a proteína-C em porcas, o inibidor C1 recombinante em coelhos, entre outras (RUDOLPH, 1999; NIEMANN e KUES, 2007).

Em conjunto esta revisão nos permite concluir que, aliada à transdução lentiviral, a transferência nuclear de célula somática (TNCS) é uma ferramenta poderosa para a produção de animais clonados geneticamente modificados. (UHM et al., 2000, 2007). Animais geneticamente modificados possuem um papel imprescindível em diversos ramos da ciência e da tecnologia. A convergência de biotecnologias como a transferência nuclear e a transferência gênica já possibilita a inserção de modificações precisas no genoma de animais de produção e sua prole, além de assegurar que toda a prole nascida será efetivamente transgênica (MURAKAMI et al., 1999; UHM et al., 2000; LAI et al., 2002; HYUN et al., 2003; HUNTER et al., 2005; KWON et al., 2006), provendo contribuições importantes para a saúde e o bem-estar humano.

## MATERIAL E MÉTODO

---

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Fluxograma das atividades

As etapas deste trabalho estão resumidas e esquematizadas na Figura 2, abaixo.

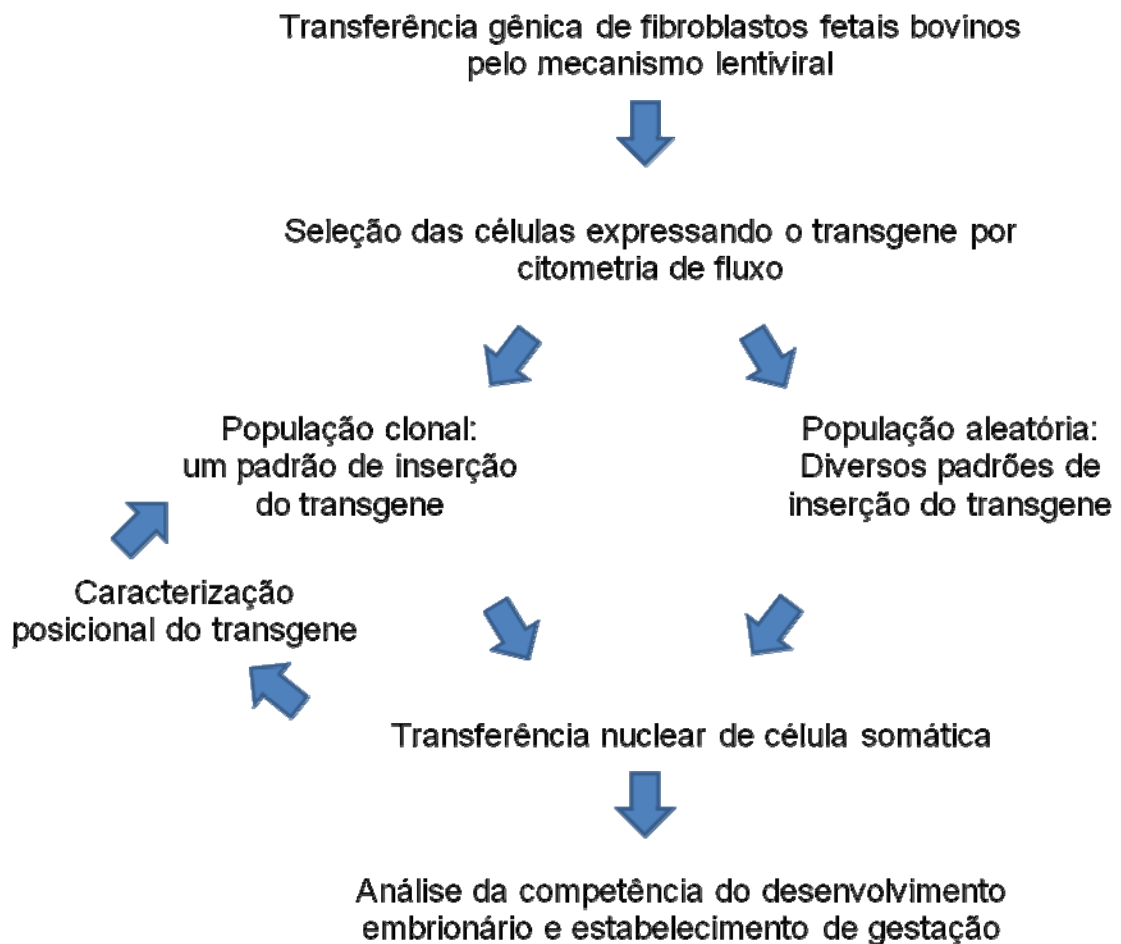


Figura 2: Fluxograma das atividades

---

## 4.2 Obtenção das células transgênicas

Neste estudo foram utilizados fibroblastos fetais bovinos oriundos do cultivo de tecido de um feto macho da raça Nelore com 55 dias de gestação. Os cultivos celulares foram mantidos, por diversas passagens durante o experimento em meio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM, Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos em estufas a 38,5°C de temperatura, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima. Quando necessário ou assim que as células entraram em confluência, a passagem celular foi realizado pela administração de tripsina 0,25%. O congelamento celular foi realizado em meio DMEM suplementado com 20% SFB, 10% dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e antibióticos, na concentração de aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células por ml, sendo 1 ml por criotubo. Cada criotubo foi resfriado a uma taxa de -1°C/min em aparelho próprio (*Cryo 1°C Freezing Container*, Nalgene). Modificações específicas no cultivo celular, quando presentes, foram indicadas no texto.

Após a obtenção, cultivo e congelamento das células em criotubos, estes foram transportados em cultivo ou congelados em nitrogênio líquido ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM), localizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR/HCFMUSP), onde foram executados os experimentos de transdução, sob orientação e em colaboração com os Profs. Drs. Bryan Eric Strauss e José Eduardo Krieger.

Foi utilizado o sistema lentiviral para a transferência gênica nos fibroblastos. O lentivírus utilizado apresenta, além da região codificadora da eGFP, um promotor para ubiquitina, uma região HIV-flap e a região regulatória pós-transcricional do vírus de hepatite da marmota (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, WRE), além das LTRs (*long terminal repeat sequences*). A figura 3 representa a porção do vetor viral que é inserida no genoma-alvo. O lentivírus utilizado não apresenta regiões de replicação, proporcionando a segurança necessária para sua manipulação.



Figura 3: Diagrama do vetor lentiviral utilizado neste experimento. Extraído e modificado de LOIS et al, 2002.

O protocolo utilizado para a transdução, resumidamente, teve início com o descongelamento de fibroblastos fetais bovinos na segunda passagem em uma placa de cultivo de 60mm. Após dois dias de cultivo ou assim que apresentaram confluência o cultivo foi transferido para uma placa de cultivo de 96 poços. Foram realizadas neste trabalho transduções em nove poços de cultivo. Deste modo, foi possível a realização da transdução de três confluências celulares diferentes (50, 70 e 90%) e três concentrações virais diferentes (1, 0,5 ou 0,25 partículas lentivirais por célula). 24 horas após o plaqueamento retirou-se o meio de cultivo dos poços nos quais as células se apresentavam morfológicamente saudáveis e adicionou-se novo meio, em quantidade reduzida, acrescido do lentivírus (concentração estimada a partir da titulação viral, já anteriormente estabelecida no laboratório supracitado) e 8µg/ml de brometo de hexametadina (Polibreno, Sigma), um polímero catiônico usado para aumentar a transdução por neutralizar a repulsão de cargas entre os vírus e as membranas celulares. Após 2 a 4 horas de incubação foi acrescentado meio de cultivo sem vírus e após 24 horas, trocou-se o meio de cultivo. A partir de então, as células foram cultivadas até sua seleção e/ou congelamento.

### 4.3 Seleção das células por citometria de fluxo

As células foram transportadas de volta ao LMMD em cultivo e/ou congeladas. O criotubo proveniente de um dos poços de cultivo foi descongelado e cultivado para os experimentos seguintes. Ao entrarem em confluência o cultivo foi repicado e as células foram submetidas à seleção (*sorting*) no citômetro de fluxo (FACSAria, BD).

Dois modos de seleção e separação por citometria de fluxo foram realizados. O primeiro separou células positivas para a expressão da eGFP de células negativas. Este cultivo de células positivas, portanto, contém células com inserções aleatórias do transgene. O segundo, foi utilizada a técnica de clonagem celular por citometria de fluxo e células expressando a eGFP foram separadas individualmente em placas de cultivo de 24 poços preenchidas com meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), garantindo a produção de linhagens clonais e portanto, com um padrão de inserção. O meio de cultivo foi trocado de duas a três vezes por semana para assegurar o suprimento das necessidades celulares. A avaliação da eficiência da clonagem celular foi realizada no décimo dia de cultivo.

### 4.4 Caracterização das populações celulares com inserções aleatórias ou clonais

Antes de serem utilizadas como células doadoras de núcleo para a TN, os fibroblastos foram submetidos a testes moleculares e biológicos para avaliação da expressão da eGFP.

#### 4.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico de cultivos de fibroblastos foi extraído segundo protocolo de NaCL. Resumidamente, o DNA foi incubado com uma solução de Proteinase K (0,53ug/ml, Gibco BRL) e SDS 20% para a digestão de proteínas e lipídeos, por 3h a 55°C. O DNA foi lavado com NaCl 5M para a peletização, separação e descarte da fase protéica. Foi precipitado com etanol e eluído em água ultrapura. A quantidade do DNA extraído foi analisada no biofotômetro (Eppendorf), assim como a qualidade, analisada pela razão das leituras a 260 e 280 nm (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

#### 4.6 Microscopia de fluorescência

A expressão da eGFP em células e tecidos fetais foi analisada sob luz ultravioleta e comprimento de onda de 500 a 515nm em microscópio Axioplan 2 (Carl Zeiss).

#### 4.7 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Para detecção do DNA exógeno inserido no DNA genômico por PCR foi construído um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação de um fragmento de 200pb do gene da eGFP (Figura 4). Em um volume total de 20µl, 60ng de DNA foi incubado com 0,2mM de cada deoxi-nucleotídeo trifosfato (dNTP, Invitrogen), 3,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2µM de cada primer forward e reverse (*F* e *R*), 0,04U/ul da enzima Taq

DNA Polimerase, (Invitrogen), H<sub>2</sub>O qsp. Foram cicladas em termociclador (Eppendorf, Figura 5).

<b>primer</b>	<b>Sequência</b>
<b>foward</b>	5' GCTACCCCGACCACATGA 3'
<b>reverse</b>	5' GTGCCCCAGGATGTTGC 3'

Figura 4: Sequência dos primers utilizados para a amplificação de uma região de 200pb do gene eGFP

<b>etapa</b>	<b>T°C</b>	<b>tempo</b>
<b>1</b>	94°C	2 min
<b>2</b>	94°C	30 seg
<b>3</b>	60°C	45 seg
<b>4</b>	70°C	45 seg
<b>5</b>	72°C	1 min

Figura 5: Programa de PCR utilizado para a amplificação de uma região de 200pb do gene eGFP. As etapas 2 a 4 foram submetidas a 35 ciclos

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo (0,5µg/µl) por 20 minutos a 100V em tampão TBE e posteriormente visualizados no aparelho Fuji Fla 3000G Laser Scanner (Fuji Film Co.). As imagens foram analisadas e armazenadas através do programa Image Gauge (Fuji Film Co.).



---

#### 4.8 Reação da Polimerase em cadeia mediada por ligação (*Ligation-mediated PCR, LM-PCR*)

O LM-PCR foi realizado em uma colônia transgênica obtida através da transferência nuclear que teve como célula doadora de núcleo uma contendo inserção aleatória. A análise da posição em que o transgene foi inserido foi realizada para que fosse possível analisar e antecipar possíveis efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário ou fetal dos embriões reconstruídos por TNCS a partir destas células. Esta colônia foi submetida aos experimentos de recloneagem.

O procedimento consiste no isolamento, amplificação, clonagem e seqüenciamento de partes do genoma que compreendem uma região específica do transgene (uma das duas *LTRs*) e a seqüência de DNA genômica subjacente a ela. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, sob orientação e supervisão da Prof. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante.

Para tanto, 2 µg de DNA genômico foram digeridos com as enzimas de restrição *MseI* e *Sac I* a 37°C por 8 horas. A *MseI* é uma enzima que sabidamente corta freqüentemente o DNA genômico. A *Sac I* é uma enzima de restrição utilizada para a otimização da técnica. O DNA digerido foi ligado a uma seqüência adaptadora composta por dois oligonucleotídeos, que por sua vez, se ligam às extremidades produzidas pela enzima *MseI*. Seguiu-se um nested PCR (Figuras 6 a 8) para a amplificação de parte do DNA genômico e das *LTRs* do inserto viral, ou seja, os produtos são compostos por seqüências lentivirais seguidas pela seqüência genômica adjacente, permitindo a identificação da região de inserção. Foi realizada a clonagem destes amplicons em bactérias competentes utilizando o kit P-GEM-T Easy Vector System (Promega) conforme especificações do fabricante. O seqüenciamento dos clones bacterianos foi realizado em aparelho ABI 377 (Applied Biosystems).

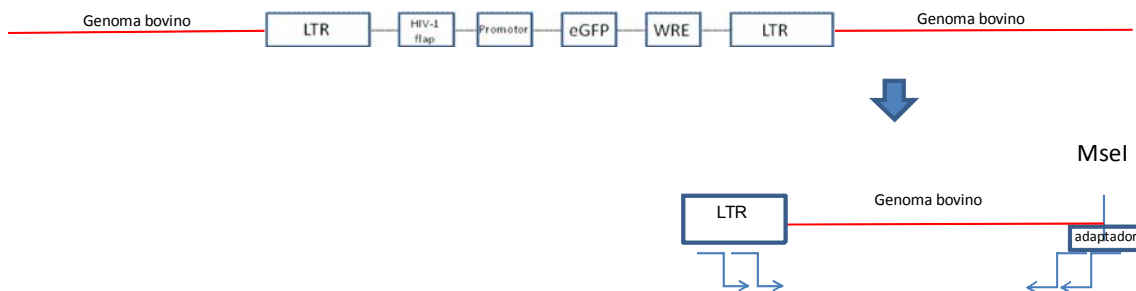


Figura 6: Esquema representativo da integração do vetor lentiviral no genoma bovino. A região amplificada pelo PCR nested é indicada pelas setas

primer	Sequência
PCR 1 - foward	5' AGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC3'
PCR 1 - reverse	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
PCR 2 - foward	5' GTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC 3'
PCR 2 - reverse	5' AGGGCTCCGCTTAAGGGAC 3'

Figura 7: Sequência dos primers utilizados para a amplificação da região lentiviral adjacente ao genoma bovino.

---

---

<b>etapa</b>	<b>T°C</b>	<b>tempo</b>
<b>1</b>	95°C	2 min
<b>2</b>	95°C	25 seg
<b>3</b>	55°C	30 seg
<b>4</b>	72°C	35 seg
<b>5</b>	72°C	5 min

Figura 8: Programa de PCR utilizado para a amplificação da região lentiviral adjacente ao genoma bovino. As etapas 2 a 4 foram submetidas a 35 ciclos

Desta colônia celular, foram analisados 36 possíveis locais de inserção do genoma, ou seja, 36 colônias provenientes da clonagem bacteriana, em triplicata nos dois sentidos da fita de DNA.

As seqüências encontradas foram analisadas pelo software Chromas (Technelysium Pty Ltd) e comparadas concomitantemente ao genoma bovino e à seqüência específica lentiviral pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Seqüências que apresentaram a parte lentiviral e a parte do genoma bovino foram analisadas quanto à posição cromossomal do transgene.

#### **4.9 Produção de animais transgênicos através da transferência nuclear**

Foram realizadas rotinas de transferência nuclear que tiveram como objetivo principal a análise da competência de desenvolvimento embrionário de embriões reconstruídos com fibroblastos fetais transgênicos em diferentes condições e seu potencial de estabelecimento de

gestações. Nestes experimentos foram analisadas as taxas de fusão, clivagem, número de blastocistos produzidos no 7º dia de cultivo *in vitro* e taxa de prenhez aos 30 dias de gestação dos embriões reconstruídos por TN.

#### 4.9.1 Preparo das células doadoras de núcleo

Linhagens celulares de fibroblastos transgênicos clonais ou com inserção aleatória em diversas passagens foram utilizadas como fonte doadora de núcleos. As células foram submetidas à privação de soro (DMEM + 0,5% de SFB) por 48h antes de cada procedimento de reconstrução oocitária ou repicados para o experimento seguinte.

Especificamente, nos experimentos de reclonagem da célula doadora de núcleo, foram utilizados como doadores de núcleo fibroblastos fetais provenientes de dois fetos bovinos, sendo um não transgênico e não clone, cujo cultivo foi submetido à transdução lentiviral e posterior seleção antes da transferência nuclear (população celular aleatória), e outro clone transgênico, e portanto, já submetido a uma reprogramação nuclear (população celular clonal).

#### 4.9.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Oócitos foram recuperados pela aspiração manual de folículos de ovários provenientes de abatedouros e selecionados quanto à sua qualidade morfológica. Os complexos *cumulus*-oócito (COC) selecionados foram maturados *in vitro* em meio de cultivo TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO<sub>3</sub>, suplementado com 10% de SFB, piruvato (22µg/ml),

---

gentamicina (50 $\mu$ g/ml), hormônio folículo estimulante (FSH, 0,5 $\mu$ g/ml) e hormônio luteinizante (LH, 50 $\mu$ g/ml) em gotas de 90 $\mu$ l de meio de maturação cobertas com óleo mineral

#### 4.9.3 Enucleação e reconstrução oocitária

Após 18 horas de MIV, COCs tiveram suas células do cúmulo retiradas utilizando sucessivas pipetagens em uma solução de hialuronidase 0,2% (m/v) em solução de PBS e então selecionados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar. Oócitos selecionados foram então submetidos à enucleação, que consiste na retirada da placa metafásica oocitária através da aspiração por micromanipulação. Os oócitos foram corados com 10 $\mu$ g/mL de bizbenzimidazina (Hoechst 33342, Sigma) em meio SOF (VAJTA et al., 1999) e o material aspirado foi submetido à luz UV para confirmação da retirada do material genético. Os procedimentos de micromanipulação foram realizados em SOF tamponado com HEPES (HSOF; WELLS et al., 1999) suplementado com 10% de SFB e 7,5 $\mu$ g/mL de citocalasina B. A reconstrução foi realizada inserindo fibroblastos dos diferentes grupos doadores de núcleo, para o espaço perivitelínico do citoplasto receptor, sendo transferida somente uma célula por citoplasto. Os complexos citoplasto-célula foram eletrofundidos em solução de 0,3 M de manitol, 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM HEPES e 0,05% BSA, induzida por dois pulsos diretos de 2,25 kV/cm durante 45  $\mu$ seg cada em eletrofusor Multiporator (Eppendorf). As taxas de fusão foram determinadas 30 a 60 minutos após a eletrofusão pela análise da fusão da membrana celular com a membrana do oócito, e portanto, não visualizando a célula no espaço perivitelínico.

#### 4.9.4 Ativação dos oócitos reconstruídos

Oócitos reconstruídos foram quimicamente ativados 26 horas após o início da MIV, utilizando 5 $\mu$ M de ionomicina (Sigma) por 5 minutos em TCM 199 tamponado com HEPES e suplementado com BSA (1mg/ml), seguido de incubação em SOF suplementado com 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6DMAP, Sigma) por três horas.

#### 4.9.5 Produção de embriões partenogênicos

Um grupo de oócitos não manipulados e maturados por 26h foram partenogeneticamente ativados pelo mesmo procedimento descrito no item anterior em cada procedimento de transferência nuclear. Tal procedimento constitui um grupo de controle interno do procedimento de transferência nuclear, especificamente da etapa de ativação química dos embriões reconstruídos.

#### 4.9.6 Cultivo embrionário *in vitro*

Grupos de 15-25 embriões foram cultivados em microgotas de 90 $\mu$ L de SOF contendo 5mg/mL de BSA livre de ácidos graxos e 2,5% de SFB, em sistema de co-cultivo com células da granulosa, cobertas por óleo mineral. O cultivo embrionário em todos os momentos foi

realizado em estufas a 38,5°C de temperatura, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em ar e umidade máxima. Aos 3 dias de cultivo foram avaliados quanto à clivagem e aos sete dias quanto ao desenvolvimento a blastocisto.

#### **4.10 Transferência de embriões**

Embriões em estágio de blastocisto no sétimo dia de cultivo foram envasados em meio HSOF em palhetas de 0,25ml. Foram inovulados em fêmeas bovinas sete dias após a manifestação de cio induzido por injeção de 150µg de um análogo de prostaglandina F<sub>2α</sub> (D-cloprostenol, Preloban, Intervet).

#### **4.11 Diagnóstico de gestação**

Trinta dias pós-estro, o diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrasonográfico por via transretal com aparelho Aloka SSD-900 (Aloka Co., Tóquio, Japão) equipado com transdutor linear de 5MHz. Receptoras com diagnóstico positivo foram abatidas entre o 30º e 90º dia de gestação.

#### **4.12 Confirmação da presença do transgene nos produtos de gestação**

Foi realizado o cultivo de fibroblastos fetais de cada um dos fetos obtidos neste estudo. Os cultivos celulares foram utilizados para a extração do DNA genômico e para a armazenagem de células para experimentos futuros.

Os fibroblastos fetais foram analisados quanto à expressão da eGFP através de microscopia de fluorescência e PCR, procedimentos descritos anteriormente, além da visualização pelo aparelho GFsP-5 (BLS Ltd), gentilmente cedido pela Professora Associada Mariz Vainzof, Centro de Estudos do Genoma Humano, Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada, IB - USP, SP , que permite a análise macroscópica da fluorescência, apesar de não ser apropriado para o registro de imagens.



RESULTADOS

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Produção das células transgênicas

Fibroblastos fetais bovinos transgênicos foram produzidos com sucesso a partir da metodologia de transdução descrita na seção material e métodos (figura 9). Após a transdução, sete poços permaneceram viáveis e apresentaram possibilidade da continuação do cultivo. As células se apresentaram saudáveis e capazes de serem mantidas em cultivo por longo tempo. A fluorescência foi analisada por citometria de fluxo, e a positividade relativa variou entre 2,95% e 9,54%, apresentando média de 6,81% (Quadro 1). Os poços não viáveis não foram utilizados no cálculo das médias pois não podem ser considerados com nula positividade.

	1:1	1:0,5	1:0,25	média
50%	x	7,31	4,79	6,05
70%	9,54	7,04	3,92	6,83
90%	x	8,99	2,95	5,97
média	9,54	7,78	3,89	<b>6,81</b>

Quadro 1: Porcentual de fluorescência analisada por citometria de fluxo de cultivos celulares submetidos a confluências celulares (porcentagem de confluência) e concentrações virais (partículas virais/células) diferentes.

Quando comparados os resultados entre as confluências celulares independentemente da concentração viral, infere-se que não houve efeito na positividade de fluorescência celular. Quando comparados os resultados entre as diferentes concentrações virais, infere-se que o grupo que recebeu menor quantidade de partículas virais apresentou menor número de células positivas comparado aos dois outros grupos.

Os sete cultivos celulares foram posteriormente submetidos ao procedimento de separação quanto à intensidade de fluorescência mediante citometria de fluxo resultando em linhagens expressando a GFP em praticamente 100% das células de maneira estável.

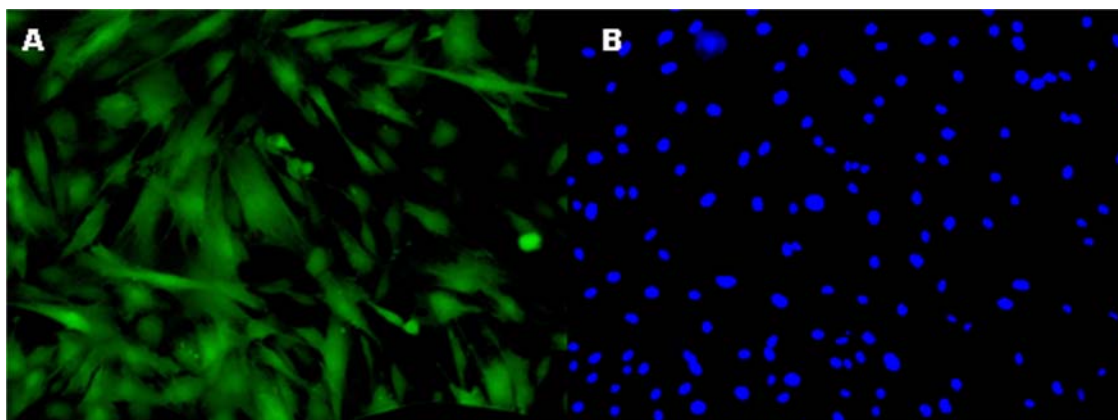


Figura 9: Fibroblastos fetais bovinos expressando o gene da GFP. (A) Imagem referente à fluorescência verde produzida pela GFP. (B) Imagem referente à coloração com Hoescht 33342 para a identificação dos núcleos celulares. Aumento 40x

## 5.2 Clonagem celular por citometria de fluxo

Fibroblastos fetais bovinos foram selecionados quanto à expressão da GFP através do mecanismo de separação celular por citometria de fluxo (Figuras 10 e 11).

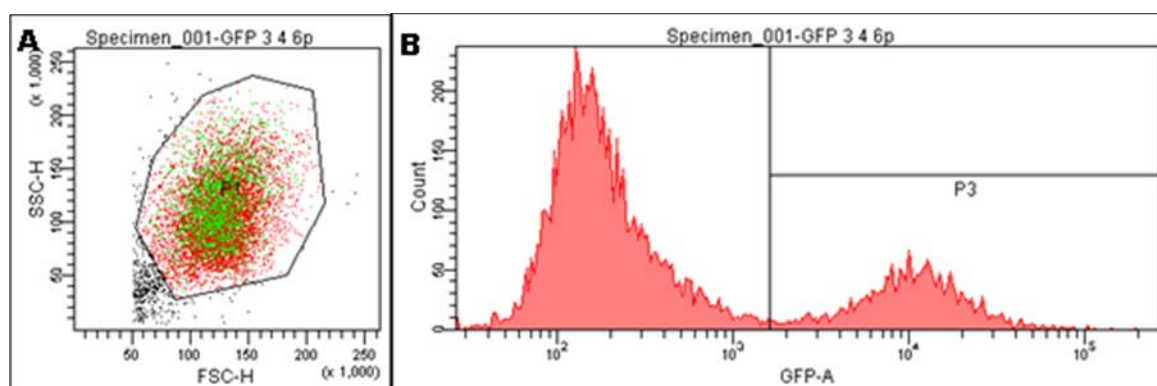


Figura 10: Imagem referente ao procedimento de identificação da população transgênica e análise da porcentagem de fluorescência por citometria de fluxo. (A) Células foram separadas de *debris* através da análise do tamanho (FSC-H) e complexidade (SSC-H). (B) As células também foram analisadas quanto à fluorescência. Células fluorescentes (P3) foram recapturadas e plaqueadas



Figura 11: Imagem referente à produção de colônias celulares após separação por citometria de fluxo. (A) colônia em cultivo aderida em placa de 24 poços sob luz branca. 40x. (B) e (C) uma colônia após tripsinização no cultivo sob luz branca e sob luz ultravioleta, respectivamente. 40x

A clonagem celular de fibroblastos não transgênicos resultou em uma eficiência média de 18,98%, apresentando uma média de 4,5 colônias aderidas em placas de 24 poços após 10 dias de cultivo *in vitro*, não diferindo ( $P > 0,05$ ) dos fibroblastos transgênicos, que apresentaram uma eficiência de 17,5%, e média de 4,2 colônias aderidas nas placas de 24 poços. As células formadoras das colônias foram plaqueadas por citometria, inicialmente, em placas de cultivo de 24 poços. A manutenção destes cultivos, porém, não foi eficiente e por vezes não foi possível de concluir as etapas do cultivo até o congelamento. As colônias tornaram-se senescentes (Figura 12) à medida que as passagens celulares foram realizadas, apresentando replicação lenta a nula. De centenas de células plaqueadas, 15 resistiram à

primeira passagem celular após o sorting. Destas, somente sete chegaram ao congelamento e somente quatro suportaram o descongelamento e continuação do cultivo.

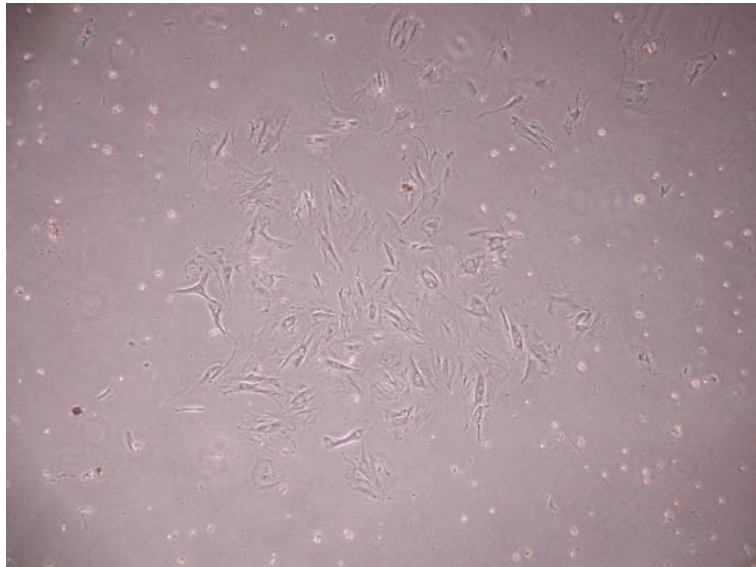


Figura 12: Imagem referente a um cultivo clonal apresentando sinais de senescência. Notar o aspecto “espraiado” das células. 40x

Cultivos clonais transgênicos também foram obtidos pelo cultivo dos fetos produzidos por transferência nuclear de fibroblastos com inserção aleatória. A eficiência deste procedimento, por sua vez, dependeu da taxa de gestação obtida. 54 embriões reconstruídos com células com inserção aleatória foram transferidos a vacas receptoras, e 3 (5,55%) gestações foram estabelecidas. Como descrito no item 4.5.2, uma destas não apresentou a modificação genética

### 5.3 Confirmação da presença do inserto nas colônias: reação da polimerase em cadeia

A imagem da figura 13 representa a amplificação do fragmento de 200pb do gene eGFP inserido no genoma celular de cada colônia celular produzida.

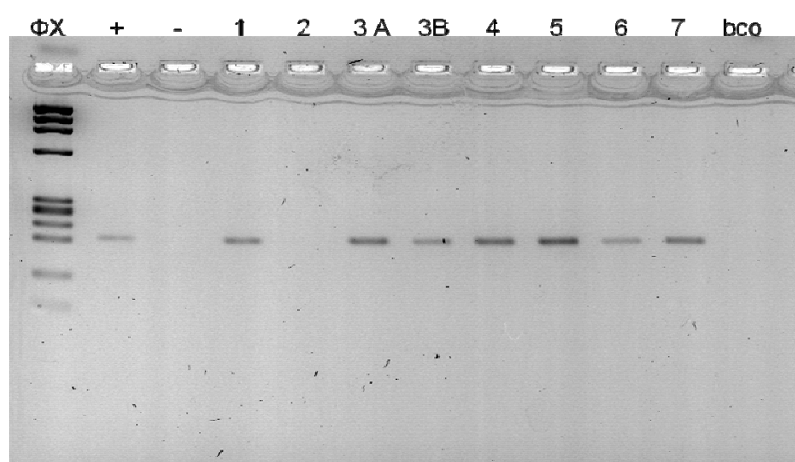


Figura 13: A imagem representa a amplificação do fragmento de 200pb do gene eGFP inserido no genoma celular. Foi utilizado peso molecular  $\Phi X$  (Invitrogen) para a comparação com a banda amplificada das colônias transgênicas. O controle negativo, como esperado, além da colônia obtida do feto 2 não apresentaram amplificação

### 5.4 Identificação da posição de inserção do transgene no genoma celular: PCR mediada por ligação (ligation-mediated PCR ou LM PCR)

Das 36 seqüências analisadas, 12 não apresentaram qualidade ou tamanho suficiente para a comparação com o genoma bovino através do programa *BLAST*. Seqüências genômicas

consideradas como sítio da inserção da construção foram aceitas somente quando apresentaram seqüências lentivirais seguidas de seqüências do genoma bovino, evitando assim inespecificidades e localizações falso-positivas. Somente três seqüências corresponderam a este pré-requisito, e todas resultaram na identificação de uma mesma região de 249pb do genoma.

Encontrou-se, portanto, que na colônia escolhida, o transgene foi inserido no cromossomo 14, em cópia única, no gene similar à subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA, mas fora de qualquer região codificadora de RNAm.

Esta colônia, deste modo, foi escolhida para a reclonagem e produção de fetos bovinos transgênicos por inferir-se que a posição do transgene não afetaria o desenvolvimento posterior do animal.

### **5.5 Produção de animais transgênicos por transferência nuclear: análise da viabilidade embrionária e da taxa de gestação.**

De modo geral, 1364 oócitos foram reconstruídos (Figura 14). Após sete dias de cultivo *in vitro* 145 (17,64%) embriões reconstruídos por transferência nuclear foram avaliados quanto à morfologia (Figura 15). Embriões competentes no desenvolvimento a blastocisto (n=101) foram transferidos individualmente ou em duplas a receptoras, resultando em 9 prenhez aos 30 dias de gestação, sendo que destas, 8 (88,9%)% apresentaram o transgene estavelmente no genoma.

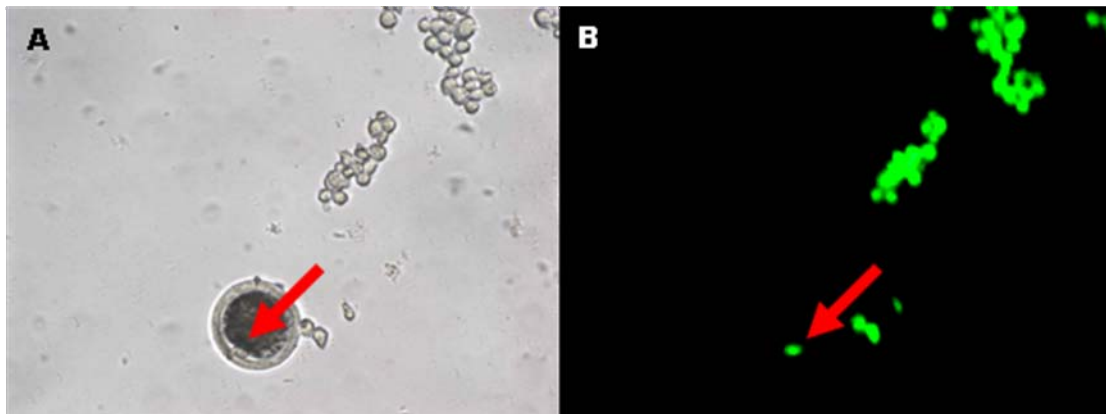


Figura 14: Imagem referente a um ócito enucleado reconstruído e diversos fibroblastos fetais expressando GFP na placa de micromanipulação. A seta indica a presença de um fibroblasto transgênico dentro do ócito, antes da fusão

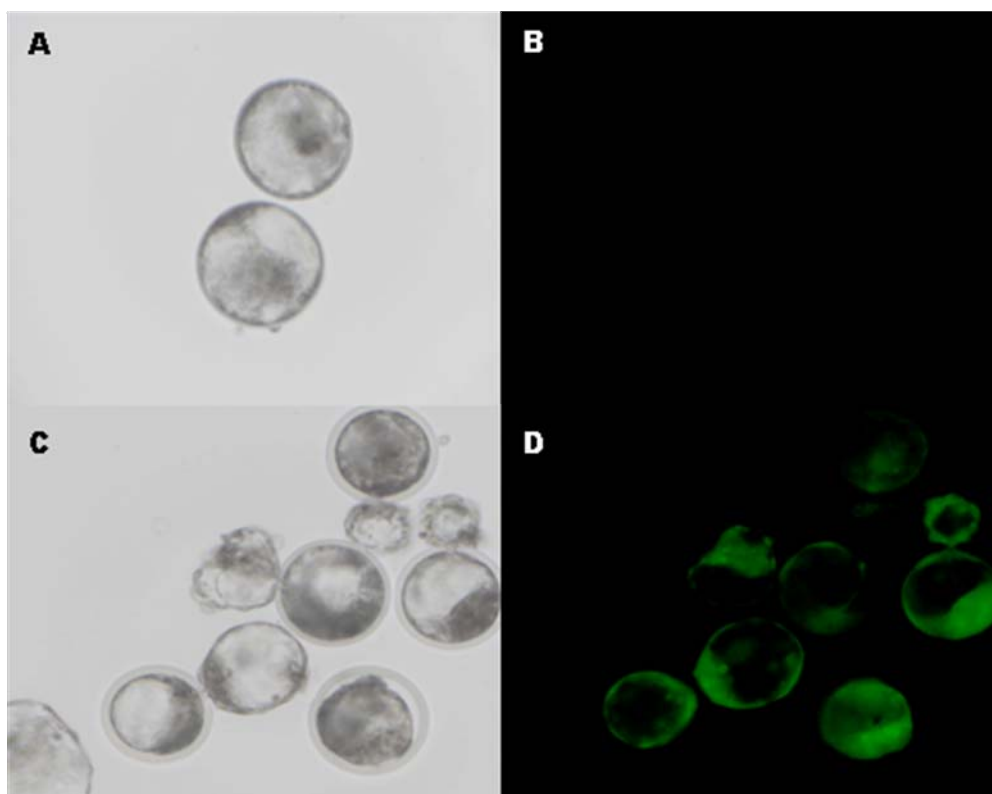


Figura 15: Embriões após sete dias de cultivo *in vitro*. (A) embriões partenogênicos em luz branca. (B) embriões partenogênicos em luz ultra-violeta. (C) embriões clones transgênicos em luz branca. (D) embriões clones transgênicos em luz ultra-violeta



### 5.5.1 Produção de animais transgênicos utilizando como células doadoras de núcleo fibroblastos fetais com diferentes períodos em cultivo

Diversas passagens celulares foram utilizadas nas rotinas de TNCS. Para a análise de eventuais influências do período de cultivo, foi analisado um total de 416 embriões neste experimento, sendo 206 (três réplicas) reconstruídos com células com menor tempo de cultivo (entre 9<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> passagem) e 210 (três réplicas) reconstruídos com células com maior tempo de cultivo (entre 18<sup>a</sup> e 21<sup>a</sup> passagem). Os resultados foram analisados por Qui-quadrado ao nível de significância de 5%. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) na taxa de fusão entre os grupos de baixas e altas passagens (63,11% e 49,15%, respectivamente). Porém, não houve diferença (Figura 16) no percentual de embriões clivados (67,69% e 69,90%) e na taxa de desenvolvimento a blastocisto (14,62% e 14,56%). Não foi constatado, portanto, efeito deletério do número de passagens no desenvolvimento embrionário quando comparados os grupos reconstruídos neste experimento.

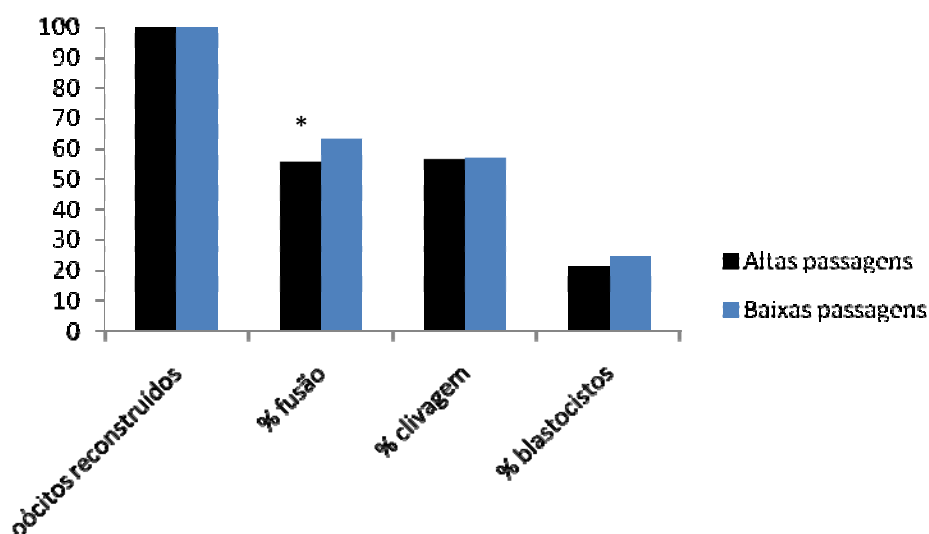


Figura 16: Gráfico representando as porcentagens de embriões fundidos dos grupos reconstruídos com células doadoras de núcleo de altas e baixas passagens em relação ao total de oócitos reconstruídos e as porcentagens de clivagem e desenvolvimento a blastocisto em relação ao total de embriões fundidos

### 5.5.2 Produção de animais transgênicos utilizando como células doadoras de núcleo: recloneamento da célula doadora de núcleo

Foram reconstruídos 1213 embriões, sendo 884 (dez réplicas) reconstruídos com células provenientes do cultivo celular com inserção aleatória e 329 (quatro réplicas) reconstruídos com células provenientes de um cultivo celular clonal. Os resultados foram analisados por Qui-quadrado ao nível de significância de 5%. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos com relação ao percentual de embriões fundidos (62,22% e 57,25% nos grupos com inserção aleatória e clonal) ou clivados (69,45% e 69,84% nos grupos com inserção aleatória e clonal). Houve diferença ( $P < 0,01$ ) entre os grupos na taxa de desenvolvimento a blastocisto (14,36% e 26,98% nos grupos com inserção aleatória e clonal, Figura 17). Pode ser observada também grande diferença no estabelecimento de gestações em relação aos grupos. 54 embriões reconstruídos com células com inserção aleatória foram transferidos a vacas receptoras, e 3 (5,55%) gestações foram estabelecidas. Uma destas não apresentou a modificação genética. Por outro lado, 39 embriões reconstruídos com células clonais foram transferidos e estes resultaram no estabelecimento de 6 (15,38%) gestações, todas portadoras da modificação genética.

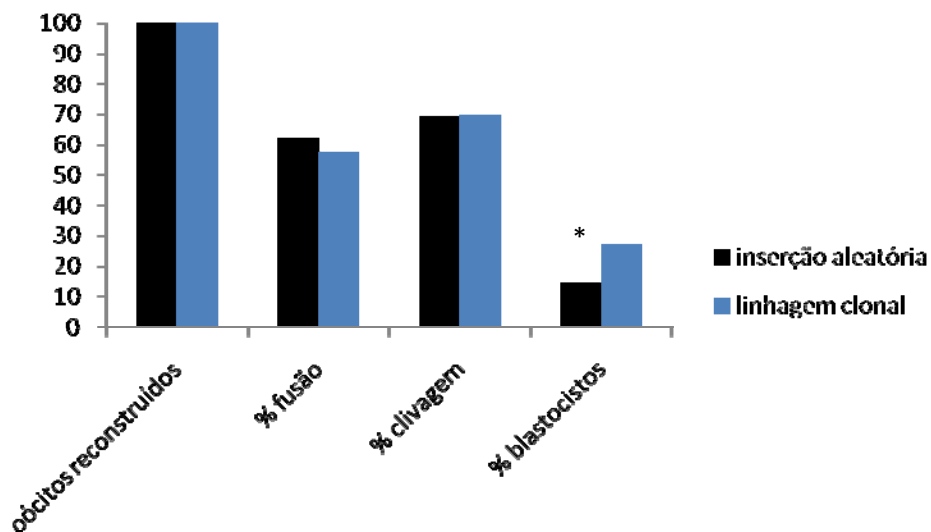


Figura 17: Gráfico representando as porcentagens de embriões fundidos dos grupos reconstruídos com células com inserção aleatória do transgene ou clonais em relação ao total de oócitos reconstruídos e as porcentagens de clivagem e desenvolvimento a blastocisto em relação ao total de embriões fundidos

### 5.6 Confirmação da presença do inserto nos fetos:

A confirmação da presença do inserto nos fetos foi realizada através da amplificação de um fragmento do gene eGFP por PCR e pela análise visual da expressão gênica da eGFP.

### 5.6.1 Reação da polimerase em cadeia

A confirmação da presença do transgene é apresentada através da eletroforese e análise da reação de PCR para a amplificação de um fragmento do gene da eGFP a seguir (Fig. 18)..

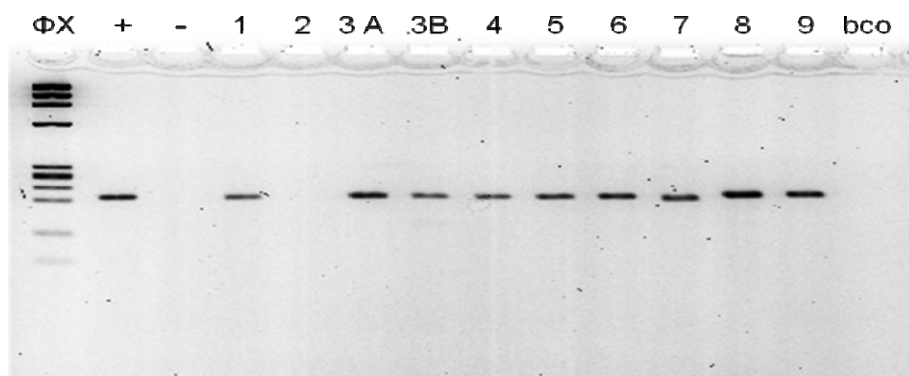


Fig 18: A imagem representa a amplificação do fragmento de 200pb do gene eGFP inserido no genoma célula. Foi utilizado peso molecular  $\Phi X$  (Invitrogen) para a comparação com a banda amplificada dos fetos transgênicos. O controle negativo, como esperado, além do feto 2 não apresentaram amplificação

### 5.6.2 Análise da expressão da eGFP

A expressão da eGFP foi confirmada em fetos de 30 dias (n=3) de gestação expondo tecidos fetais à microscopia de fluorescência (Figura 19), e expondo úteros gestantes de 60 (n=3) e 90dias (n=2) à verificação da fluorescência através do aparelho GFsP-5 (BLS Ltd, Fig.20). Neste caso, imagens foram fotografadas através das lentes do aparelho de partes nas quais o foco de luz alcançava.

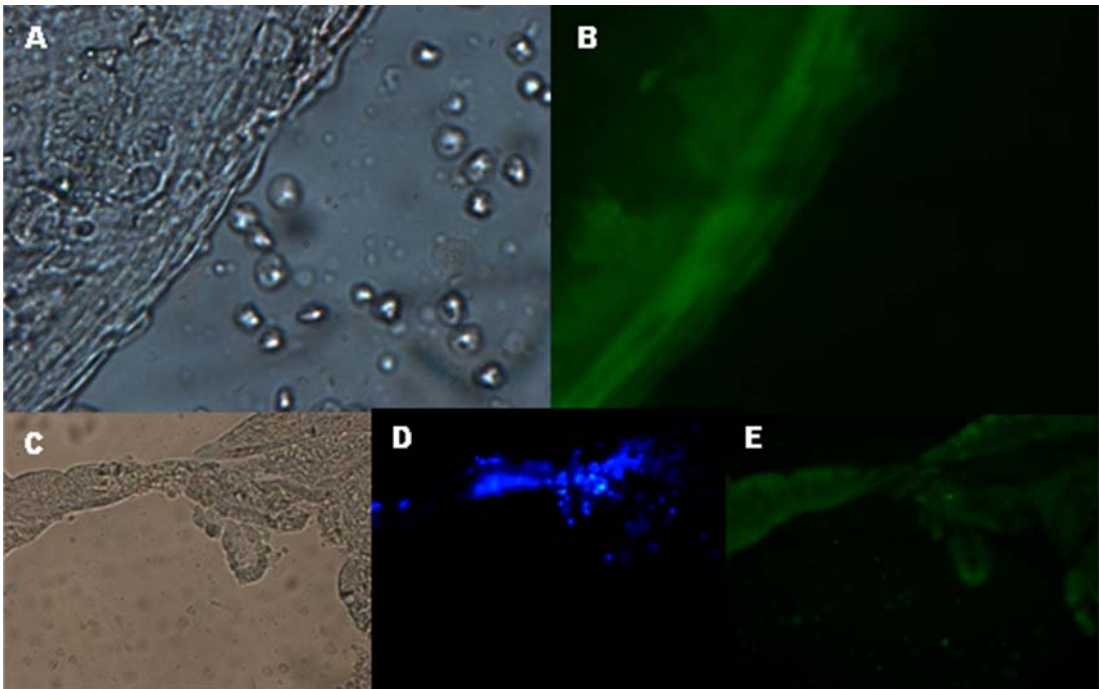


Figura 19: Imagens referentes aos fetos de 32 dias de gestação. (A) Imagem parcial do feto I e de hemácias sob luz branca. (B) Imagem parcial do feto I e de hemácias sob luz ultra-violeta, expressão da eGFP em células que não hemácias (C) Imagem parcial do feto II sob luz branca. (D) Imagem parcial do feto II sob luz ultra-violeta, coloração com Hoechst 33342 para a visualização dos núcleos celulares do feto II. (E) Imagem parcial do feto II sob luz ultra-violeta, expressão da eGFP

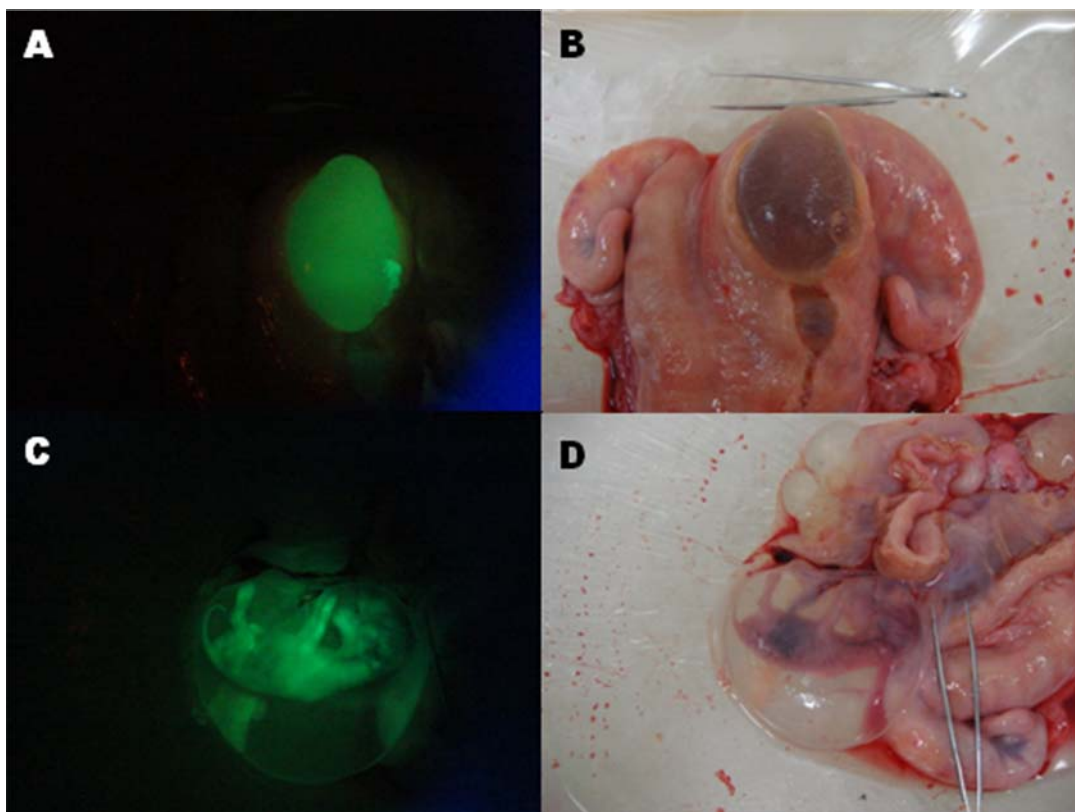


Figura 20: Análise da fluorescência da eGFP. A e B: útero gestante com exposição de parte fetal (corioalantóide). Exposição à luz ultravioleta, comprimento de onda 500 a 515nm e luz branca, respectivamente. C e D: feto bovino com 60d de gestação envolto em líquido e membrana amniótica. Exposição à luz ultravioleta, comprimento de onda 500 a 515nm e luz branca, respectivamente



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que por meio da técnica de transferência gênica pela transdução lentiviral e transferência nuclear foi possível a produção de gestações bovinas transgênicas. Especificamente, foram estabelecidas oito gestações transgênicas provenientes de rotinas de transferência nuclear que utilizaram células doadoras de núcleo contendo o transgene em local conhecido ou não de seu genoma mantidas em cultivo *in vitro* por em diversas passagens

Fibroblastos fetais bovinos tornaram-se transgênicos para o gene que codifica a proteína eGFP após transdução por mecanismo lentiviral. A positividade da expressão da proteína variou entre 2,95% e 9,54% nas células submetidas aos tratamentos utilizados neste estudo. Poucos são os dados recentes na literatura sobre a transdução viral em células. Os resultados são dependentes de diversos fatores, como concentração celular inicial plaqueada, tipo celular, concentração viral adicionada ao cultivo, entre outros. Assim como nas transfecções, portanto, a positividade de células expressando o transgene após a transdução é variável (PICANÇO, 2006).

Duas formas de clonagem celular foram apresentadas neste estudo. A primeira envolveu a técnica de citometria de fluxo e a segunda o cultivo de células de fetos produzidos por transferência nuclear. Com ambas as técnicas foi possível selecionar células transgênicas que produziram colônias celulares transgênicas com êxito. A manutenção do cultivo, contudo, foi ineficiente quando utilizada a clonagem por citometria de fluxo, enquanto foi muito bem sucedida quando células originadas dos fetos produzidos por TN foram utilizadas. De fato, o prolongamento do cultivo necessário às colônias plaqueadas por citometria pode ser prejudicial à propagação celular subsequente. Instabilidade cromossômica, encurtamento de telômeros, organização anormal do fuso mitótico, além de outras alterações cromossômicas que se acumulam durante os repiques são as principais características relacionadas com o elevado tempo de cultivo e conseqüente diminuição da viabilidade celular em cultivo (BENN, 1976; GIRALDO et al., 2004; MASTROMONACO et al., 2006).

A literatura ainda destaca a importância da suplementação do cultivo em baixa densidade celular, como por exemplo, os cultivos provenientes de células únicas deste estudo.



---

Agentes como  $\beta$ -mercaptoetanol e cisteamina podem favorecer a proliferação de colônias derivadas de uma única célula, provavelmente pela sua atividade antioxidante (INUI et al., 1997; COOKE et al., 2008). Uma vez que este estudo não objetivou a otimização da clonagem celular, a proliferação das colônias pode ter sofrido pela falta de suplementação.

Ao total, 1364 oócitos foram reconstruídos neste estudo, 145 (17,64%) blastocistos foram produzidos e 101 foram transferidos a receptoras. Nove gestações foram diagnosticadas 30 dias após a TN, sendo uma gemelar. A produção de embriões e prenhez transgênicas obtidas neste estudo foi compatível com a descrita na literatura. O sucesso de desenvolvimento a blastocisto é normalmente atingido por 7 a 30%, aproximadamente, dos embriões reconstruídos por TN (ROH et al., 2000; CHO ET al., 2004; LEE et al., 2007). Já o sucesso do estabelecimento de prenhez pode variar de 6 a 48%, (ZAKHARTCHENKO et al., 2001; ARAT et al., 2002; GONG et al., 2004; IGUMA et al., 2005). É importante ressaltar que comparações entre resultados de produção transgênica precisam ser cautelosas, uma vez que metodologias diferentes, com objetivos diferentes e em espécies animais diferentes, são utilizadas em cada estudo.

Neste estudo, 9 dos 10 fetos apresentaram o transgene estavelmente incorporado ao genoma. A gestação não transgênica foi derivada da TN que utilizou uma população de células doadoras de núcleo com inserção aleatória no genoma. Uma possível impureza da seleção por citometria e separação pela expressão do gene codificante para a proteína fluorescente foi a causa mais provável desta gestação não portadora da modificação genética. Apesar de pouco significativa em termos de quantidade, a contaminação do cultivo com células não transgênicas é possível, assim como também é possível, e por vezes comum, a falha de seleção de colônias transgênicas quando genes de resistência a antibióticos são utilizados como genes repórteres.

Foi analisado o possível efeito do tempo de cultivo sobre a competência de desenvolvimento a blastocistos de embriões produzidos por TNCS reconstruídos com células transgênicas. Apesar de a transdução lentiviral proporcionar uma seleção mais rápida das células, é possível que a diminuição do período de cultivo não seja suficiente para superar os efeitos deletérios do cultivo *in vitro*. Neste experimento foram comparadas duas faixas distintas de passagens celulares, porém a menor já tinha sido replicada nove vezes. Foi encontrada uma menor taxa de fusão oócito-célula no grupo reconstruído com células de

---

passagens mais tardias. Outros estudos contemporâneos seriam necessários para a avaliação desta diferença. Segunda a literatura, a explicação se basearia na diminuição da viabilidade celular devido ao longo período em cultivo, como já discutido acerca da viabilidade celular das colônias celulares obtidas neste experimento. Entretanto, não foi observado efeito deletério na competência de desenvolvimento embrionário do grupo reconstruído com elevado período em cultivo em relação ao de menor período. Tal resultado concorda com as observações feitas por Cho et al. (2004), que consideraram baixo período de cultivo entre 2 e 4 passagens e alto período 8 a 12, Kubota et al (2000), que consideraram 5 e entre 10-15 como baixos e alto período. Nesses estudos não foram encontradas diferenças na produção de blastocisto entre os grupos experimentais. De fato, Kubota et al. (2000) relataram prenhez bem sucedidas quando transferidos às receptoras embriões reconstruídos por TN com células com até 15 passagens. Por outro lado, Merigue, em 2007, conduziu experimentos de transferência nuclear utilizando como células doadoras de núcleo fibroblastos adultos entre a 3ª e a 12ª passagens, considerando passagens tardias aquelas entre a 9ª e a 12ª, e encontrou menor competência de desenvolvimento a blastocisto entre embriões reconstruídos com células oriundas de cultivos de maior número de passagens. Tal fato está em concordância com Roh et al., (2000) que obteve resultados semelhantes com células doadoras de núcleo submetidas a poucas (8-16) ou muitas (17-32) passagens celulares. Há um consenso na literatura quanto aos efeitos deletérios do prolongado tempo de cultivo na viabilidade celular. Todavia, como discutido acima, o tempo de cultivo pode não ser prejudicial à reprogramação nuclear destas células. É provável que outros fatores sejam responsáveis pela maior ou menor competência de reprogramação nuclear e sustentação do desenvolvimento embrionário. Segundo Poehland et al. (2007), a influência da linhagem celular por si só é maior do que a influência do número de passagens. Os efeitos relacionados a ciclo celular, anomalias cromossômicas e diminuição da viabilidade são importantes mas podem não ser suficientes para a discriminação de células adequadas à transferência nuclear. Os autores sugerem que um maior entendimento sobre regulação epigenética no programa de expressão gênica poderá trazer esclarecimentos importantes sobre o sucesso da reprogramação nuclear.

Outro fator importante em experimentos de transferência gênica é a utilização das células doadoras de núcleo com inserções aleatórias e desconhecidas no genoma. Tal efeito, como discutido a seguir, pode ter influenciado a competência de desenvolvimento a blastocisto e estabelecimento da prenhez dos embriões reconstruídos no presente experimento.

Dado que as técnicas mais comuns e as mais eficientes proporcionam uma inserção aleatória (CLARK et al., 2000), o conhecimento da posição de inserção do transgene e fatores que influenciam sua expressão, ou mesmo o contrário, que influenciam a expressão de genes endógenos, é de grande utilidade para o sucesso da engenharia genética. Para tal, precisam ser analisadas populações clonais de células doadoras.

Um segundo experimento, portanto, foi conduzido para avaliar o efeito da reclonagem e caracterização posicional do transgene sobre o desenvolvimento embrionário e estabelecimento de prenhez. Células com inserções aleatórias, ou seja, desconhecidas quanto ao número e posição de inserção no genoma, assim como células cultivadas a partir de um dos primeiros fetos transgênicos produzidos neste estudo foram utilizadas na reconstrução de embriões clones. Estas últimas, portanto, foram consideradas em procedimento de “reclonagem”, por serem submetidas a uma nova reprogramação nuclear. Foi observado efeito benéfico desta reclonagem nuclear no desenvolvimento a blastocisto dos embriões clonados (26,98% de blastocistos produzidos no grupo clonal comparado a 14,36% do grupo com inserção aleatória), assim como no estabelecimento de gestações (15,38% do grupo clonal e 5,55% do grupo com inserção aleatória) quando analisada a confirmação de prenhez em relação ao número de blastocistos transferidos. Células obtidas do cultivo submetido à reclonagem também foram estudadas quanto à localização cromossomal do transgene, para que possíveis efeitos posicionais de inserção pudessem ser relacionados com a competência de desenvolvimento embrionário ou fetal. Foi identificado que a população clonal possui uma inserção única, no cromossomo 14, em região não-transcrita. Esta informação especula que a inserção transgênica destas células não representa efeito deletério na formação e desenvolvimento embrionário ou fetal, o que seria possível se a inserção estivesse localizada em alguma região transcrita do genoma. Tal especulação, portanto, concorda com os resultados obtidos neste experimento, uma vez que uma maior taxa de desenvolvimento a blastocisto e um maior número de prenhez por embrião transferido foram conseguidos com a reclonagem deste cultivo celular.

Neste experimento discutem-se dois aspectos principais, que são o efeito da reclonagem e o posicionamento do transgene. Também em Fujimura et al. (2007), e em Kuroiwa et al. (2002), a reclonagem proporcionou uma maior taxa de blastocistos e um número maior de prenhez estabelecidas e proles nascidas. A reclonagem possibilita a

utilização de cultivos com poucos ou nenhum repique, evitando o acúmulo de anormalidades celulares descritas acima. Ademais, já tiveram seu núcleo reprogramado com sucesso uma vez.

Paralelo a este possível efeito individual da célula, a seleção de células mediante estudo do local de inserção do transgene, permite uma produção mais eficiente de animais transgênicos, uma vez que possibilita evitar a transferência de embriões que portarão modificações genéticas indesejadas como knock-outs acidentais de genes primordiais para o desenvolvimento embrionário, fetal ou mesmo peri-natal. (YAMAUCHI et al., 2007).

Neste trabalho, embriões reconstruídos por TNCS a partir de células com maior ou menor período de cultivo não apresentaram diferença na competência de desenvolvimento a blastocisto; porém, quando utilizadas como células doadoras de núcleo fibroblastos reclonados ou não, houve uma maior produção de blastocistos no grupo reconstruído com células reclonadas. Tal efeito benéfico também pôde ser observado no estabelecimento de prenhez, dado bastante importante para a otimização da produção de animais de produção transgênicos. Maiores estudos ainda são necessários para um melhor entendimento dos processos limitantes das técnicas de transferência gênica e de transferência nuclear. A combinação de ambas, porém, mostrou-se capaz do estabelecimento de prenhez bovinas transgênicas.

Experimentos futuros devem ser realizados para determinar com maior precisão qual característica da célula reclonada permite uma maior produção de embriões e fetos transgênicos. Um experimento bastante importante e esclarecedor será o estudo da posição de inserção do transgene no genoma celular de cultivos clonais provenientes da separação por citometria de fluxo ou pela recuperação de fetos clonados, que deverá ser relacionado com o desenvolvimento embrionário, fetal e mesmo peri-natal de embriões reconstruídos por TNCS.

CONCLUSÕES

---

## 7 CONCLUSÕES

O mecanismo lentiviral mostrou-se eficaz no estabelecimento de cultivos de fibroblastos transgênicos, e estes se mantiveram viáveis por diversas passagens.

Aliada à transferência nuclear de células somáticas, a transdução lentiviral mostrou-se capaz de manter um desenvolvimento embrionário viável e de estabelecer prenhezés bovinas.

Células com diferentes períodos de cultivo não diferiram quanto à competência de desenvolvimento a blastocisto, enquanto células recloneadas são significativamente mais eficientes na produção de blastocistos transgênicos produzidos por TNCS, assim como no subsequente desenvolvimento gestacional.

REFERÊNCIAS

---

---

## 8 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARAT, S.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, S. J.; RESPESS, D. S.; TUMLIN, M.; STICE, S. L. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1768-1774, 2002.

BAGUISI, A.; BEHDOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTRÖM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 456-461, 1999.

BALDASSARRE, H.; KEEFER, C.; WANG, B.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. **Cloning and Stem Cells**, v. 5, p. 279-285, 2003.

BENN, P. A. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. **American Journal of Human Genetics**, v. 28, p. 465-473, 1976.

BHUIYAN, M. M.; CHO, J.; JANG, G.; PARK, E.; KANG, S.; LEE, B.; HWANG, W. Effect of transfection and passage number of ear fibroblasts on in vitro development of bovine transgenic nuclear transfer embryos. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, p. 257-261, 2004.

BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BILODEAU, A. S.; PONTES, J.H.; ARNOLD, D.; FECTEAU, G.; KEEFER, C.; SMITH, L. C. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2013-2023, 2003.

BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M. H.; ROBERTSON, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, v. 309, p. 55-256, 1984.



---

BRINSTER, R. L.; CHEN, H. Y.; TRUMBAUER, M. E.; AVARBOCK, M. R. Translation of globin messenger RNA by the mouse ovum. **Nature**, v.283, p. 499-501, 1980.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T.; WELLS, D.; L'HUILLIER, P.; LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 157-162, 2003.

BURKE, J. Texas A&M University - CVM Researchers first to clone White-tailed  
CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, London, v.380, p.64-66, 1996.

CAMPBELL, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v.407, p.505-509, 2000.

CAMPBELL, KH.; FISHER, P.; CHEN, W. C.; CHOI, I.; KELLY, R. D.; LEE, J. H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68, p. 214-231, 2007.

CHALFIE, M.; TU, Y; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**,v. 263, p. 802-805, 1994.

CHESNE, P.; ADENOT, P. G.; VIGLIETTA, C.; BARATTE, M.; BOULANGER, L.; RENARD, J. P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 366- 369, 2002.

CHO, J.; BHUIYAN, M. M.; SHIN, S.; PARK, E.; JANG, G.; KANG, S.; LEE, B.; HWANG, W. Development potential of transgenic somatic cell nuclear transfer embryos according to various factors of donor cell. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, p. 1567-1573, 2004.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; LEÓN, F. A. P.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256-1258, 1998.

CLARK, A. J.; BURL, S.; DENNING, C.; DICKINSON, P. Gene targeting in livestock: a preview. **Transgenic Research**, v. 9, p. 263-275, 2000.

---

COLLAS, P.; PINTO-CORREIA, C.; PONCE DE LEON, F. A.; ROBL, J. M. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 501-511, 1992.

COOKE, S. L.; NORTHUP, J. K.; CHAMPAIGE, N. L.; ZINSER, W.; EDWARDS, P. A.; LOCKHART, L. H.; VELAGALETI, G. V. Molecular cytogenetic characterization of a unique and complex de novo 8p rearrangement. **American Journal of Medicine and Genetics**, v. 146, p. 1166-1172, 2008.

DAI, Y.; VAUGHT, T. D.; BOONE, J.; CHEN, S. H.; PHELPS, C. J.; BALL, S.; MONAHAN, J. A.; JOBST, P. M.; McCREATH, K. J.; LAMBORN, A. E.; COWELLUCERO, J. L.; WELLS, K. D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I. A.; AYARES, D. L. Targeted disruption of the alpha1,3- galactosyltransferase gene in cloned pigs. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 251-255, 2002.

DENNING, C.; BURL, S.; AINSLIE, A.; BRACKEN, J.; DINNYES, A.; FLETCHER, J.; KING, T.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W. A.; ROLLO, M.; De SOUSA, P.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; CLARK, A.J. Deletion of the alpha(1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 559-562, 2001.

DUNN, D. A. ; KOOYMAN, D. L. ; PINKERT, C. A. Transgenic animals and their impact on the discovery industry. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 757-767, 2005.  
FELGNER, P. L.; GADEK, T. R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 84, p. 7413-7417, 1987.

FOLLENZI, A.; AILLES, L. E.; BAKOVIC, S.; GEUNA, M.; NALDINI, L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. **Nature Genetics**, v. 25, p. 217-222, 2000.

FUJIMURA, T.; MURAKAMI, H.; KUROME, M.; TAKAHAGI, Y.; SHIGEHISA, T.; NAGASHIMA, H. Effects of recloning on the efficiency of production of alpha 1,3- galactosyltransferase knockout pigs. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, p. 58-62, 2008.

FUNAHASHI, H.; IDETA, A.; KONISHI, M.; URAKAWA, M.; URUNO, K.; AOYAGI, Y.; OKABE, M.; NIWA, K. Nuclear transfer of blastomeres expressing EGFP-reporter gene may improve the efficiency of transgenic cattle. **Cloning and Stem Cells**, v. 3, p. 183-190, 2001.

---

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**, v. 424, p. 635, 2003.

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A. M.; BREVINI, T. A.; ACOCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D. T. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction Development**, v. 49, p. 168-175, 1998.

GIRALDO, R.; FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, M. E. Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. **Plasmid**, v. 52, p. 69-83, 2004.

GOLDING MC, LONG CR, CARMELL MA, HANNON GJ, WESTHUSIN ME. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. **Proceedings of the National Academic Science**. v.103, p.5285-5290.2006.

GONG, G.; DAI, Y.; FAN, B.; ZHU, H.; WANG, H.; WANG, L.; TANG, B.; LI, R.; WAN, R.; LIU, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, L.; SUN, X.; LI, N. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. **Molecular Reproduction Development**, v.69. 2004.

GORDON, J. W.; RUDDLE, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, v. 214, p. 1244-1246, 1981.

GROPP, M.; ITSYKSON, P.; SINGER, O.; BEN-HUR, T.; REINHARTZ, E.; GALUN, E.; REUBINOFF, B. E. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 7, p. 281-287, 2003.

HABERMANN, F. A. ; WUENSCH, A. ; SINOWATZ, F. ; WOLF, E. Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. **Theriogenology**, v. 68, p. 116-124, 2007.

HAMMER, R. E. ; PURSEL, V. G. ; REXROAD, C. E. ; WALL, R. J. ; BOLT, D. J. ; PALMITER, R. D. ; BRINSTER, R. L. Genetic Engineering of mammalian embryos. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 269-278, 1985.

---

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

HOFMANN, A.; KESSLER, B.; EWERLING, S.; KABERMANN, A.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. **Molecular Therapy**, v. 13, p. 59-66, 2006.

HOFMANN, A.; KESSLER, B.; EWERLING, S.; WEPPERT, M.; VOGG, B.; LUDWIG, H.; STOJKOVIC, M.; BOELHAUVE, M.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. **EMBO Reports**, v.4, p.1054-1060, 2003.

HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biology of Reproduction**, 2004.

HOUDEBINE, L. M. Métodos de gerar animais transgênicos e controle da expressão gênica In: Animais Transgênicos: princípios e métodos. Sociedade Brasileira de Genética, 349f.

HOUDEBINE, L. M. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression, **Journal of Biotechnology**, v. 98, p. 145-160, 2002.

HOUDEBINE, L. M. Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Research**, v. 9, p. 305-320, 2000.

HOUDEBINE, L. M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 40, p. 269-281, 2005.

HUNTER, C. V. ; TILEY, L. S. ; SANG, H. M. Developments in transgenic technology : applications for medicine. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 11, p. 293-298, 2005.

HYUN, S.; LEE, G.; KIM, D.; KIM, H.; LEE, S.; NAM, D.; JEONG, Y.; KIM, S.; YEOM, S.; KANG, S.; HAN, J.; LEE, B.; HWANG, W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1060-1068, 2003.

---

IGUMA, L. T.; LISAUSKAS, S. F.; MELO, E. O.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; VIANNA, G. R.; SOUSA, R.V.; DODE, M. A.; ARAGÃO, F. J.; RUMPF, R. Development of bovine embryos reconstructed by nuclear transfer of transfected adult fibroblasts cells. **Genetics and. Molecular Research**, v.4, p. 55-66, 2005.

IKAWA, M.; TANAKA, N.; KAO, W. W. Y.; VERMA, I. M. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentivirus vectors for gene therapy. **Molecular Therapy**, v. 8, p. 666-673, 2003.

ILLMENSEE.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, v. 23, p. 9-18, 1981.

INUI, K.; OREFFO, R. O.; TRIFFITT; J. T. Effects of beta mercaptoethanol on the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells. **Cell Biology International**, v. 21, p .419-425, 1997.

JAENISCH, R. Transgenic animals. **Science**. v. 240, p.1468-1474, 1988.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, v. 282, p. 2095-2098, 1998.

KEEFER, C. L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.5-12, 2004.

KOO, D. B.; KANG, Y. K.; CHOI, Y. H.; PARK, J. S.; KIM, H. N.; KIM, T.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Developmental potential and transgene expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells. **Molecular Reproduction Development**, v. 58, p. 15-21, 2001.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proceedings of the National Academic Science**. v.97, p.:990-995, 2000.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v.22, p.286-294, 2004.

---

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; CHOI, Y. J.; NAEEM, R.; TOMIZUKA, K.; SULLIVAN, E. J.; KNOTT, J. G.; DUTEAU, A.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A.; ISHIDA, I.; ROBL, J. M. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 889-894, 2002.

KWON, D.J.; PARK, C. K.; YANG, B. K.; KIM, C. I.; CHEONG, H. T. Effects of maturational age of recipient oocytes and activation conditions on the development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 100, p. 211-215, 2007.

LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PARK, K-W.; CHEONG, H-T.; GREENSTEIN, J. L.; IM, G-S.; SAMUEL, M.; BONK, A.; RIEKE, A.; DAY, B. N.; MURPHY, C. N.; CARTER, D. B.; HAWLEY, R. J.; PRATHER, R. S. Production of alpha-1,3- galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. **Science** v.295, p.1089-1092, 2002.

LEE, S. L.; KUMAR, B.M.; KIM, J. G.; OCK, A. S.; JEON, B.G.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 44-52, 2007.

LINNEY, E.; HARDISON, N. L.; LONZE, B. E.; LYONS, S.; DINAPOLI, L. Transgene expression in zebrafish: A comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. **Developmental Biology**, v. 213, p. 207-216, 1999.

LISAUSKAS, S. F.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. Characterization of transgene integration loci in transformed Madin Darby bovine kidney cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 456-60, 2007.

LOIS, C.; HONG, E. J.; PEASE, S.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**, v.295. p. 905-919, 1992.

MAKRIDES, S. C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. **Protein Expression and Purification**, v. 17, p. 183-202, 1999.

MASTROMONACO, G.F.; PERRAULT, S. D.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. **BMC Developmental Biology**, v. 9; p. 6:41. 2006.

---

MCGREW, M. J.; SHERMAN, A.; ELLARD, F. M.; LILLICO, S. G.; GILHOOLEY, H. J.; KINGSMAN, A. J.; MITROPHANOUS, K. A.; SANG, H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **EMBO Reports**, v. 5, p. 728-33, 2004.

MELO, E. O.; CANAVESSI, A. M.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R. Animal transgenesis: state of the art and applications. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, p. 47-61, 2007.

MERIGUE, G. K. F. Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear. 131f. Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. 2007.

MICHALKIEWICKS, M.; MICHALKIEWICKS, T.; GEURTS, A. M.; ROMAN, R. J.; SLOCUM, G. R.; SINGER, O.; WEIHRAUCH, D.; GREENE, A. S.; KALDUNSKI, M.; VERMA, I. M.; JACOB, H. J.; COWLWY Jr, A. W. Efficient transgenic rat production by lentiviral vector. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, p. 881-894, 2007.

MONTOLIU, L.; LARUE, L.; BEERMANN, F. On the use of regulatory regions from pigmentary genes to drive the expression of transgenes in mice. **Pigment Cell Research**, v. 17, p. 188-190, 2004.

MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; VARISANGA, M. D.; SUZUKI, T. Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, p. 843-847, 1999.

NAGASHIMA, H.; GIANNAKIS, C.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Sex differentiation and germ cell production in chimeric pigs produced by inner cell mass injection into blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 702-707, 2004.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, p. 263-267, 1996.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic farm animals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 762-770, 2007.

---

NOTARIANNI, E.; LAURIE, S.; NG, A.; SATHASIVAM, K. Incorporation of cultured embryonic cells into transgenic and chimeric, porcine fetuses. **International Journal of Developmental Biology**, v. 41, p. 537-540, 1997.

OBACK, B.; WELLS, D. N. Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? **Molecular Reproduction Development**, v. 74, p. 646-654, 2007.

OLIVEIRA, R. R.; CARVALHO, D. M.; LISIAUSKAS, S.; MELLO, E.; VIANNA, G.R.; DODE, M. A.; RUMPF, R.; ARAGÃO, F. J.; RECH, E. L. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. **Genetic and Molecular Research**, v. 4, p. 185-196, 2005.

PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD, M. G.; BIRNBERG, N. C.; EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. **Biotechnology**, v. 24, p. 429-433, 1992.

PANNO, J. **Animal Cloning : the science of nuclear transfer**. Facts on life science library, 2005.

PARK, F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? **Physiological Genomics**, v. 31, p.159–173, 2007.

PICANÇO, V. P. Clonagem e expressão do fator VIII de coagulação humano.185f. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2006.

POEHLAND, R.; AL-ROSTUM, F.; BECKER, F.; VIERGUTZ, T.; BRUNNER, R. M.; KANITZ, W.; BHOJWANI, S. Donor cell lines considerably affect the outcome of somatic nuclear transfer in the case of bovines. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 737-748, 2007.

POLEJAEVA, I. A.; CAMPBELL, K. H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. **Theriogenology**, v. 53, p. 117-126, 2000.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S-H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H.



---

Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v. 407, p. 86-90, 2000.

PUNZÓN, C.; ALCAIDE, A.; FRESNO, M. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebotium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1293-1299, 2003

ROH, S.; SHIM, H.; HWANG, W. S.; YOON J. T. In vitro development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. **Reproduction and Fertility Development**, v. 12, p. 1-6, 2000.

RUDOLPH, N. S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 367-374, 1999.

RULICKE, T.; HUBSCHER, U. Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. **Experimental Physiology**, v. 85, p.589-601, 2000.

SALAMONE, D.; BARAÑAO, L.; SANTOS, C.; BUSSMANN, L.; ARTUSO, J.; WERNING, C.; PRYNC, A.; CARBONETTO, C.; DABSYS, S.; MUNAR, C.; SALABERRY, R.; BERRA, G.; BERRA, I.; FERNÁNDEZ, N.; PAPOUCHADO, M.; FOTI, M.; JUDEWICZ, N.; MUJICA, I.; MUÑOZ, L.; ALVAREZ, S. F.; GONZÁLEZ, E.; ZIMMERMANN, J.; CRISCUOLO, M.; MELO, C. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 469-472, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iork, NY, EUA. 2001

SCHINIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor XI transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130-2133, 1997

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130-2133, 1997.

---

SHIGA, T.; OPPENHEIM, R. W. Close spatial-temporal relationship between islet-1-expressing cells and growing primary afferent axons in the dorsal spinal cord of chick embryo. **Journal of Comparative Neurology**, v. 405, p. 388-393, 1999.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v. 415, p. 859, 2002.

SIMONS, J. P.; MCCLENAGHAN, M.; CLARK, A. J. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. **Nature**, v. 328, p. 530-532, 1987.

UHM, S. J.; GUPTA, M. K.; KIM, T.; LEE, H. T. Expression of Enhanced Green Fluorescent Protein in Porcine- and Bovine-Cloned Embryos Following Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer of Fibroblasts Transfected by Retrovirus Vector. **Molecular Reproduction and Development**, p.1-10, 2007.

UHM, S. J. ; KIM, N. H. ; KIM, T. ; CHUNG, H. M. ; CHUNG, K. H. ; LEE, H. T. ; CHUNG, K. S. Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistant (Neo(R)) genes in porcine embryos following nuclear transfer with porcine fetal fibroblasts transfected by retrovirus vector. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 331-337, 2000.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open-pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, p. 939-948, 1999.

VOSS, A. K.; THOMAS, T.; GRUSS, P. Germ line chimeras from female ES cells. **Experimental Cell Research**, v.230, p.45-9. 1997

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C. F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v.394, p.369-374.1998.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 996-1005, 1999.

WHEELER, M. B.; CLARK, S. G.; BEEBE, D. J. Developments in in vitro technologies for swine embryo production. **Reproduction and Fertility Development**, v. 16, p. 15-25. 2004.

- 
- WHEELER, M. B. Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. **Journal of Animal Science**, v.81, p.32-37, 2003.
- WHEELER, M. B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. **Reproduction and Fertility Development**, v. 6, p. 563-568, 1994.
- WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v. 320, p. 63-65, 1986.
- WILLIAMS, A.; HARKER, N.; KTISTAKI, E.; VEIGA-FERNANDES, H.; RODERICK, K.; TOLAINI, M.; NORTON, T.; WILLIAMS, K.; KIOUSSIS, D. Position effect variegation and imprinting of transgenes of lymphocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p.2320-2329, 2008.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, p.810-813, 1997.
- YAMAUCHI, Y.; DOE, B.; AJDUK, A.; WARD, M. A. Genomic DNA damage in mouse transgenesis. **Biology of Reproduction**, v. 77, p .803-812, 2007.
- YANG, S-H.; AGCA, Y.; CHENG, P-H.; YANG, J-J.; AGCA, C.; CHAN, A. W. S. Enhanced Transgenesis by Intracytoplasmic Injection of Envelope-Free Lentivirus. **Genesis**, v. 45, p. 177–183, 2007.
- ZAKHARTCHENKO, V. ; ALBERIO, R. ; STOJKOVIC, M. ; PRELLE, K. ; SCHERNTHANER, W. ; STOJKOVIC, P. ; WENIGERKIND, H. ; WANKE, R. ; DÜCHLER, M. ; STEINBORN, R. ; MUELLER, M. ; BREM, G. ; WOLF, E. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54. p. 264-272, 1999.
- ZAKHARTCHENKO, V.; MUELLER, S.; ALBERTO, R.; SCHERNTHANER, W.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; WANKE, R.; LASSNIG, C.; MUELLER, M.; WOLF, E.; BREM, G. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 362-369. 2001.
- ZHOU, Q.; RENARD, J. P.; Le FRIEC, G.; BROCHARD, V.; BEAUJEAN, N.; CHERIFI, Y.; FRAICHARD, A.; COZZI, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science**, v.302, p.1179, 2003.