

- João Bosco Pesquero
- Heloísa Allegro Baptista

- Conceito
- Introdução e histórico
- Transgênico por adição ou modelo de superexpressão de um gene
- Modelo *knockout*
- Aplicações dos animais transgênicos
- Considerações finais
- Referências bibliográficas
- Súmulas

CONCEITO

O organismo cujo patrimônio genético (genoma) foi artificialmente manipulado pela introdução, modificação ou deleção de um gene, alterando todas as células do organismo inclusive as células germinativas (óvulos e espermatozóides) de tal forma que a modificação genética seja transmitida aos seus descendentes (Fukamizu, 1993).

O termo transgênico engloba diferentes tipos de modelos animais:

- transgênico por adição ou modelo de superexpressão de um gene, onde várias cópias deste genes (endógeno ou de outra espécie) são adicionadas ao genoma;
- modelos *knockout* e *knockin*, onde um gene endógeno é inativado (*knockout*) ou previamente modificado e substituído no genoma (*knockin*).

INTRODUÇÃO E HISTÓRICO

Antes do aparecimento das técnicas de biologia molecular aplicadas à genética, os únicos modelos animais disponíveis para se estudar a regulação, a função de genes e a compreensão dos sistemas biológicos de mamíferos eram os mutantes espontâneos ou os mutantes obtidos por agentes químicos. As mutações espontâneas permitem identificar um gene por meio de um fenótipo patológico ou anormal diferente do animal convencional, como, por exemplo, diferenças na cor do pêlo e padrão de pigmentação. Dessa forma, foram identificados e clonados os genes responsáveis pela diabetes e obesidade em animais de experimentação que se diferenciavam pelos seus fenótipos anormais⁶¹. Com os avanços das técnicas de biologia molecular e celular e da engenharia genética, novas metodologias passaram a ser empregadas tornando possível a manipulação do DNA com o objetivo de alterar o genoma de forma controlada. As técnicas para a geração de modelos transgênicos representam, portanto, uma das mais promissoras biotecnologias tanto para fins comerciais como para diversas áreas da pesquisa básica e clínica.

Pouco antes da década de setenta os primeiros trabalhos sobre transgênicos foram publicados, nos quais foi descrita a introdução de fragmentos de DNA em células somáticas procarionóticas e eucarióticas *in vitro* e a indução da expressão de genes em células do tecido nervoso e do sangue^{14,36}.

Em espécies de reprodução sexuada a obtenção de linhagens com alterações genéticas depende da indução de mutações nos gametas para que estas sejam transmitidas aos descendentes. O embrião de um camundongo desenvolve-se a partir da fecundação do óvulo por um espermatozóide, no oviduto da fêmea. Segue-se a formação do zigoto, que passa por divisões sucessivas até se tornar um blastocisto contendo

cerca de 200 células. Em 1968, Richard L. Gardner isolou células de um embrião de camundongo, injetou em outros embriões e os transferiu para o útero de fêmeas prenhas, gerando camundongos com células vindas dos dois embriões, os chamados animais quimeras. A manipulação dos embriões *in vitro* foi indispensável para o sucesso de todas as técnicas transgênicas como veremos a seguir¹³.

A introdução de material genético exógeno em embriões de camundongo ocorreu antes do aparecimento das técnicas de DNA recombinante em, 1974, quando Rudolf Jaenisch e Beatriz Mintz observaram a presença de DNA viral exógeno em diversos tecidos de camundongos após a microinjeção do vírus SV40 no interior da cavidade blastocística de embriões (Tabela 52.1). Entretanto, nestes experimentos não foi observada integração do gene exógeno nas células germinativas uma vez que não houve transmissão aos descendentes³². Estudos posteriores demonstraram o sucesso na integração de DNA exógeno nas células germinativas após exposição de embriões de camundongo ao retrovírus da leucemia murina de Moloney (M-MuLV) com transmissão da alteração genética aos descendentes^{29,30}. Em 1980, Gordon e cols. introduziram a técnica de microinjeção pronuclear de uma construção viral em embriões recém fertilizados para a geração de um camundongo transgênico por adição, entretanto, não foi observada transmissão aos descendentes¹⁷. Em 1982, a primeira linhagem de camundongos transgênicos produzida pela técnica de microinjeção pronuclear foi caracterizada por Richard Palmiter, da Universidade da Pensilvânia, Ralph Brinster da Universidade de Washington e colaboradores. Nesse estudo inédito, esses pesquisadores tinham como objetivo produzir animais com um fenótipo alterado com relação aos irmãos não-transgênicos, no caso, animais apresentando maior tamanho. Para tal, geraram uma construção de DNA (transgene) contendo o gene do hormônio de crescimento de rato antecedido por uma seqüência promotora responsável pela ativação do gene em vários tecidos do animal. Centenas de cópias desta construção foram microinjetadas em pronúcleos de embriões de camundongos, e, no dia seguinte os mesmos foram transferidos para mães de aluguel. Dos vinte e um camundongos nascidos, seis carregavam o DNA exógeno e atingiram um tamanho duas vezes maior que os irmãos não-transgênicos. Esse resultado foi um marco no desenvolvimento de animais transgênicos, despertando grande atenção da mídia em todo o mundo quando o camundongo “gigante” foi publicado na capa da revista científica *Nature*⁴¹.

Enquanto os primeiros animais transgênicos eram desenvolvidos, outros pesquisadores, em 1981, isolaram pela primeira vez células embrionárias totipotentes (ES, do inglês, *stem cells*) capazes de gerar todos os tecidos do embrião¹⁰. Em 1986, Gossler e colaboradores geraram os primeiros camundongos quiméricos obtidos a partir de células ES provando definitivamente que estas células eram capazes de gerar um indivíduo completo¹⁸.

Tabela 52.1
Histórico da Transgênese no Mundo

1974	Jaenisch R. e Mintz B. • microinjeção de DNA viral em blastocistos
1976 1977	Jaenisch R. • exposição de embriões ao retrovírus M-MuLV
1980	Gordon J.W. • primeira microinjeção de DNA viral em embriões
1981	Evans M. • isolamento de células-troncoembrionárias (<i>ES cells</i>)
1982	Palmiter R.D. • camundongo transgênico "gigante"
1987	Thomas K.R. e Capecchi M.R. • mutação sítio-específica por recombinação homóloga em <i>ES cells</i>
1989	Schwartzbeger P.L. • camundongo <i>knockout</i> via <i>ES cells</i> e recombinação homóloga

Em 1987, dois grupos de pesquisadores obtiveram êxito na geração de mutações sítio-específicas em células-troncoembrionárias por recombinação homóloga na qual um gene específico pode ser modificado ou inativado do genoma^{7, 52}. Este acontecimento possibilitou, pouco tempo depois, a geração dos primeiros modelos *knockout* de camundongo por Schwartzberg e colaboradores, demonstrando a viabilidade de transmissão de uma mutação introduzida em um gene para as células germinativas por recombinação homóloga⁴⁹. Esta mesma técnica possibilitou a geração dos primeiros modelos *knockin* em que um gene de interesse é modificado em células-troncoembrionárias em cultura e posteriormente integrado no genoma de camundongos⁵⁰.

Atualmente, um revolucionário modelo transgênico que está sendo utilizado no estudo da função de genes *in vivo* é o *knockout* condicional. A técnica baseia-se na utilização do Sistema de Recombinação CRE/loxP, desenvolvida por Orban e cols. em 1992, que permite eliminar um gene endógeno ou um transgene, bem como ativar um transgene no genoma de forma controlada, ou seja, em um tecido ou estágio específicos^{22,40}.

A aplicação das técnicas de transferência de genes tem tornado possível a produção de animais transgênicos de diferentes espécies, como boi, porco, ovelha, coelho, rato e camundongo, sendo que este último é o mais utilizado em pesquisas por apresentar notáveis vantagens, como menor tamanho, custo de manutenção reduzido, embriões de boa qualidade para manipulação, além de ser uma das poucas espécies cuja manutenção de células troncoindiferenciadas em

cultura é viável, o que possibilita a retirada de genes por recombinação homóloga e geração de modelos *knockout* e *knockin*^{23–24,26,38,45,55}. Outro fato importante que aponta para o uso cada vez maior dessa espécie é sua similaridade genética com o homem, como demonstrado recentemente pelo sequenciamento de seu genoma¹⁹.

TRANSGÊNICO POR ADIÇÃO OU MODELO DE SUPEREXPRESSION DE UM GENE

Transgênicos por adição são animais nos quais várias cópias de um gene (endógeno ou de outra espécie) foram adicionadas ao seu genoma. Na maioria das vezes estes animais apresentam superexpressão do gene adicionado e, conseqüentemente, aumento da proteína por ele codificada provocando um ganho de função. Uma característica importante deste modelo é que a integração do transgene ocorre aleatoriamente no genoma, podendo ser letal ao embrião ou mesmo ao indivíduo adulto caso haja inativação de um gene importante. Este fato pode levar ao aparecimento de um fenótipo independente do transgene, no animal transgênico o que exige a necessidade da comparação do fenótipo alterado em diferentes linhagens mutantes. Além disso, o número de cópias do transgene inserido no genoma não pode ser controlado, bem como o nível de expressão do mesmo, o qual é dependente do número e da posição de inserção no genoma. Entretanto, estas características da técnica podem ser valiosas do ponto de vista do estudo da função dos genes, uma vez que a integração aleatória no genoma pode gerar mutações insercionais e ocasionar efeitos fenotípicos interessantes. Ao contrário das mutações espontâneas, na transgênese por adição é possível identificar o gene mutado, o que permite sua caracterização molecular e a determinação de sua função no desenvolvimento^{20,31,37}.

Várias técnicas têm sido utilizadas para produzir animais transgênicos por adição, entre elas a microinjeção pronuclear¹⁷, infecção de embriões por vetores retrovirais³⁹, agregação de células tronco embrionárias geneticamente modificadas^{18,59}, transferência de segmentos de cromossomos⁴⁶ e transferência de DNA mediada por espermatozoides³⁴.

PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA A PRODUÇÃO DE TRANSGÊNICOS POR ADIÇÃO

Transferência mediada por espermatozoides

O uso potencial de espermatozoides como vetores para transferência gênica é uma idéia antiga, tendo sido descrita no início da década de 70 por Bracket *et al.* (1971)³, que demonstraram a capacidade de o vírus SV40 se ligar ao espermatozoide. Outros trabalhos posteriores renovaram o interesse pelo assunto quando descreveram a produção de camundongos³⁴ e porcos¹² transgênicos após fertilização *in vi-*

tro de oócitos com espermatozóides incubados com DNA. Apesar destes resultados não terem sido reproduzidos com êxito por outros laboratórios, várias tentativas foram feitas para se estabelecer a metodologia, devido à sua simplicidade e ao seu uso potencial para a geração de animais transgênicos de diferentes espécies. Desde a introdução da técnica de microinjeção pronuclear, o método sempre foi o mais utilizado pelos pesquisadores para a introdução de um gene exógeno em camundongos. Entretanto várias tentativas foram feitas, utilizando esta técnica com o objetivo de se gerar animais transgênicos de grande porte, tais como suínos, ovinos, caprinos e bovinos, sem entretanto obter sucesso. A eficiência na produção destas espécies transgênicas por microinjeção pronuclear é muito baixa, sendo o insucesso causado pela baixa taxa de integração do transgene, baixa viabilidade dos embriões e necessidade de grande habilidade na micromanipulação. Entretanto, recentemente Chang e cols., (2002), utilizando uma nova técnica altamente eficiente baseada em um anticorpo monoclonal capaz de ligar-se a um antígeno de superfície do espermatozóide, descreveram a geração de camundongos e porcos transgênicos expressando a enzima fosfatase alcalina e interferon β -humanos. O anticorpo liga-se a um antígeno de superfície de várias espécies testadas, como porco, camundongo, galinha, ovelha e humano. Devido a sua característica básica, o anticorpo liga-se também ao DNA através de interações iônicas, possibilitando ao DNA exógeno manter-se ligado especificamente ao espermatozóide, sendo posteriormente carregado ao núcleo do embrião após fertilização.

Infecção Viral

Consiste no cultivo de embriões em fase de blastocisto em presença de uma alta concentração de vetores retrovirais no meio de cultura. Inicialmente, um vetor é construído contendo seqüências retrovirais ligadas ao gene de interesse que se deseja adicionar ao genoma. Esta construção se integra no genoma de algumas células embrionárias em cultura, produzindo animais quiméricos nos quais apenas alguns tipos celulares apresentam o DNA exógeno. O que se espera é que a integração ocorra nas células linhagem de células germinativas e, após o cruzamento, dêem origem a descendentes geneticamente modificados. Deste modo, é possível obter animais transgênicos de quaisquer espécies com relativa facilidade já que não são necessários os equipamentos e a experiência de micromanipulação. Além disso, esta técnica é uma opção interessante para a transgênese de espécies cujos embriões não são acessíveis ou são de baixa qualidade, inviabilizando a microinjeção pronuclear, como é o caso de animais como a galinha e o porco. Entretanto, a infecção retroviral apresenta limitações quanto ao tamanho da seqüência a ser inserida no vetor viral bem como quanto à baixa freqüência de integração do transgene nas células germinativas. Apesar dessas desvantagens, a infecção viral de embriões de camundongo com o retrovírus da leucemia Moloney permitiu a geração de

primeira linhagem de animais transgênicos²⁹⁻³⁰. Um dado importante é que o aprimoramento da transgênese viral tem contribuído para o desenvolvimento da terapia gênica e celular, onde os vetores virais são utilizados para inserir genes de interesse em células tronco derivadas de embriões ou da medula óssea, que, por sua vez, podem ser integradas ao organismo e gradualmente atenuar diversos tipos de doenças.

Microinjeção pronuclear

Atualmente, a microinjeção pronuclear é a técnica utilizada pela grande maioria dos centros para a geração de animais transgênicos por adição. Esta técnica permite a introdução de seqüências longas de DNA de diferentes espécies no genoma de mamíferos, produzindo altos níveis de expressão e integração do transgene nas células germinativas. Utilizando-se um micromanipulador acoplado a um microscópio de alta resolução, centenas de cópias de uma construção de DNA (endógeno ou de outra espécie) são injetadas diretamente em um dos pronúcleos de embriões recém-fertilizados coletados do oviduto de fêmeas doadoras superovuladas. Os pronúcleos são os núcleos materno e paterno provindos do óvulo e do espermatozóide, respectivamente, antes que se unam para formar um único núcleo contendo o genoma do novo indivíduo. Após a microinjeção os embriões são transferidos para o oviduto de uma fêmea receptora pseudográvida previamente acasalada com um macho vasectomizado que levará a termo o nascimento dos possíveis transgênicos posteriormente genotipados quanto à presença do gene exógeno. Como já citado no item 3, a integração do transgene por microinjeção pronuclear ocorre de forma aleatória no genoma e todas as células do animal são geneticamente modificadas, inclusive as germinativas, de modo que esta alteração será transmitida aos seus descendentes. Todo o animal transgênico positivo originado de um embrião microinjetado é classificado como um fundador de uma linhagem transgênica única que difere de outro fundador quanto ao local de inserção e número de cópias do transgene no genoma. O protocolo detalhado de manipulação dos animais para a adição de um gene pode ser encontrado em manuais e revisões da literatura^{15, 27}.

ETAPAS DA MICROINJEÇÃO PRONUCLEAR

Construção do DNA

O sucesso da microinjeção pronuclear depende da qualidade do DNA que será injetado nos embriões. Inicialmente o gene que se quer adicionar é clonado e a seqüência de nucleotídeos da região codificadora deve ser conhecida, pois esta seqüência será responsável pela formação da proteína que o animal transgênico deverá produzir³¹. A construção do DNA ou transgene deve conter algumas seqüências imprescindí-

veis para a ativação do gene, como a seqüência promotora, a região codificadora da proteína e uma seqüência da região 3' do gene não traduzida (Fig. 52.1). A seqüência promotora definirá a especificidade da expressão do gene e pode dirigir sua expressão tanto para todos os tecidos do organismo como para tecidos específicos. No primeiro caso a expressão do gene acontece em uma grande variedade de células, pois o objetivo é estudar o efeito da superexpressão do gene em todo o animal. Um exemplo bastante conhecido é o promotor do gene da metalotioneína utilizado na geração do camundongo transgênico gigante citado no item 2 deste capítulo, entre outros modelos⁵¹. No segundo caso o promotor dirige a expressão do transgene para determinados estágios ou células, como, por exemplo, o promotor da cadeia leve de miosina que dirige a expressão do gene especificamente para o tecido cardíaco⁴³.

O DNA utilizado para a microinjeção pronuclear deve ser preparado em tampão específico e purificado para garantir a ausência de contaminantes como fenol, etanol e enzimas, os quais podem danificar o embrião. As moléculas de DNA utilizadas para a microinjeção devem estar na forma linear e o tamanho do transgene não deve exceder 50 kb, apesar de estes parâmetros não ser em limitantes na frequência de transgênicos positivos. O volume de DNA injetado no pronúcleo é bastante difícil de ser controlado, entretanto, estima-se que são introduzidos cerca de 1-2 picolitros/injeção

por pronúcleo. A única variável a ser controlada é a concentração de DNA para injeção que deve ser de 1-2 ng/μL, o que corresponde a 200-400 moléculas de DNA/pL para um fragmento de 5 kb.

Superovulação de fêmeas doadoras

A técnica de microinjeção requer um grande número de óvulos, uma vez que, para cada tentativa de geração de animal transgênico, pelo menos 100 embriões recém-fertilizados são injetados. A administração intraperitoneal de gonadotrofinas em fêmeas pré-púberes com idade entre 3 e 5 semanas leva à superovulação, com uma média de 30 óvulos produzidos por fêmea. Inicialmente cada fêmea recebe 5UI de gonadotrofina coriônica obtida de éguas prenhas (PMSG — *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) que mimetiza o hormônio estimulante dos folículos (FSH — *Follicle-stimulating Hormone*) e, após 42 a 48 horas, 5UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG — *Human Chorionic Gonadotropin*) são administradas mimetizando o pico do hormônio luteinizante (LH) que amadurece os folículos e induz a liberação dos óvulos do ovário para o oviduto. No mesmo dia, após o hCG, cada fêmea é colocada separadamente com um macho fértil, e, no dia seguinte, faz-se a verificação da presença de tampão vaginal decorrente da cristalização do sêmem após a

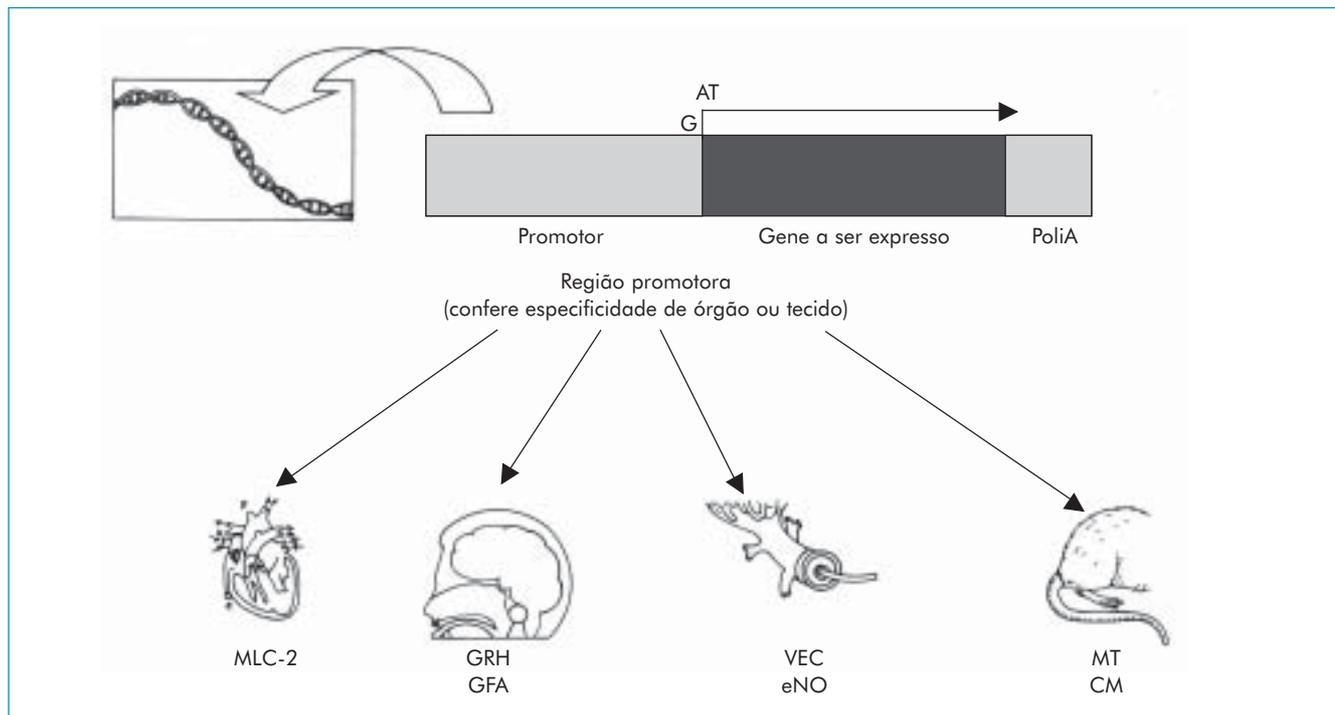


Fig. 52.1 — Esquema da construção de DNA utilizada para a geração de animais transgênicos contendo região promotora, região codificadora e cauda poli-A. Estes são alguns exemplos de promotores tecido-específicos. MLC-2= cadeia leve da miosina; GHRH= receptor do hormônio liberador de gonadotrofina; GFAP= proteína ácida fibrilar glial; VEC= células endoteliais vasculares; eNOS= sintase de óxido nítrico endotelial; MT= metalotioneína; CMV= citomegalovírus

copulação. Em geral, mais de 80% das fêmeas apresentam tampão positivo, as quais são sacrificadas por deslocamento cervical e procede-se a abertura da cavidade abdominal com a retirada dos ovidutos e dos embriões que são lavados em meio de cultura e transferidos para uma estufa até o momento da microinjeção.

Microinjeção de pronúcleos

A microinjeção pronuclear é realizada com o auxílio de dois micromanipuladores laterais acoplados a um microscópio invertido de alta resolução (Fig. 52.2). Durante este estágio os embriões apresentam os pronúcleos (masculino e feminino) visíveis, entretanto, o pronúcleo masculino é geralmente escolhido para receber o transgene por ser maior e localizar-se mais próximo à membrana citoplasmática do embrião, o que facilita a microinjeção. O micromanipulador do lado esquerdo acoplado a uma micropipeta mantém o embrião fixo através de sucção contínua e controlada. Com o auxílio do micromanipulador do lado direito e em aumento de 200 ou 400 X, uma microagulha contendo o DNA é introduzida em um dos pronúcleos e um volume de cerca de 2 picolitros é injetado provocando um aumento do pronúcleo de cerca de 30%. Os embriões microinjetados são transferidos para o oviduto de receptoras ou “mães de aluguel” pseudogravídas que são preparadas acasalando-se fêmeas em estro natural com idade mínima de 6 semanas com machos vasectomizados ou geneticamente estéreis. Várias linhagens po-

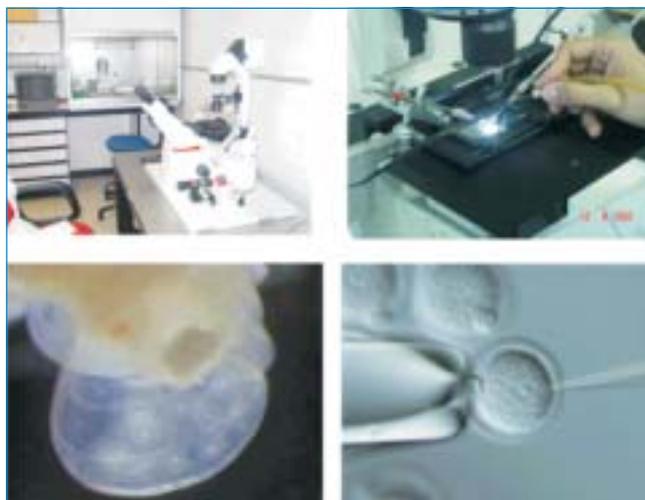


Fig. 52.2 — Micromanipulador acoplado ao microscópio invertido utilizado na microinjeção de embriões (em cima à esquerda). Detalhe das agulhas de sucção e injeção do sistema de micromanipulação (em cima à direita). Fotografia de um oviduto retirado de uma fêmea doadora contendo massa de embriões no momento da coleta (embaixo à esquerda, aumento de 20X). Microinjeção do DNA em um embrião contendo os pronúcleos (embaixo à direita, aumento de 400X).

dem ser utilizadas, entretanto, normalmente são usadas fêmeas albinas que apresentam cor de pelagem distinta das doadoras o que garante que qualquer animal nascido seja realmente derivado dos embriões doados.

Transferência de embriões para o oviduto

Embriões em estágio de uma célula até blastocisto (>16 células) podem ser transferidos para fêmeas receptoras pseudogravídas 0,5 a 3,5 dias após acasalamento, respectivamente, desde que aptas para levar a gestação a termo. A idade embrionária e as condições uterinas da fêmea receptora devem ser cuidadosamente sincronizadas. Embriões de uma célula até mórula (16 células) são transferidos para o oviduto de fêmeas pseudogravídas após 0,5 dia do acasalamento. A transferência pode ser realizada no mesmo dia da microinjeção ou no dia seguinte, quando os embriões atingem o estágio de duas células. Antes da transferência uma avaliação do embrião é realizada, baseada no número de células e na qualidade morfológica do mesmo que deve apresentar citoplasma claro, zona pelúcida intacta e ausência de fragmentos citoplasmáticos. A transferência faz-se inserindo uma pipeta contendo os embriões na porção inicial do oviduto e depositado-os lentamente. Aproximadamente 10 dias após o nascimento, a ponta da cauda dos filhotes é cortada, o DNA é extraído e a análise do transgene no genoma dos filhotes é realizada pelas técnicas de *Southern blot* ou de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Fig. 52.3). A primeira requer fragmentos de DNA conhecidos como sondas porque se ligam em regiões do DNA cujas seqüências fazem parte exclusivamente do transgene. Na técnica de PCR são necessários pequenos oligonucleotídeos específicos para dar início à amplificação de múltiplas cópias do transgene. Em ambas as técnicas, as amostras de DNA resultantes são submetidas a eletroforese em gel de agarose, produzindo bandas visíveis sob luz ultravioleta ou em filmes de raios X. Conforme o êxito de todo o procedimento de transgênese, aparecerá no gel uma banda de migração correspondente à construção de DNA integrado no genoma. O primeiro animal nascido contendo o transgene é chamado de Fundador e é heterozigoto uma vez que a integração do DNA exógeno se dá em apenas um dos alelos cromossômicos.

Obtenção de linhagem homozigota

O estabelecimento de uma linhagem transgênica requer a identificação de indivíduos homozigotos eliminando a necessidade de genotipar cada geração nascida. Existem vários métodos de identificação disponíveis, entre eles, a quantificação do número de cópias do transgene integradas, a quantificação do produto transgênico ou fenótipo, hibridização *in situ* do núcleo, cruzamento-teste etc. O cruzamento-teste é

um método definitivo pois a transmissão do transgene para os descendentes é de 100%; entretanto é um método caro e trabalhoso uma vez que a quantidade de indivíduos genotipados é grande. Após atingir três semanas, o Fundador é colocado para acasalar com indivíduos não-transgênicos e seus descendentes F1 heterozigotos são analisados para a presença do transgene por PCR ou *Southern blot* (Fig. 52.3). Em geral, de 10 a 50% da ninhada apresentam o DNA exógeno. Após três semanas os irmãos heterozigotos são acasalados entre si gerando 25% de animais F2 homozigotos. Estes animais são testados quanto à sua homozigose pelo acasalamento com animais não transgênicos e análise dos descendentes. Um casal fundador deve ser mantido para manutenção da linhagem transgênica.

MODELO KNOCKOUT

O termo alteração genética controlada é definido como a introdução de modificações sítio-específicas no genoma por recombinação homóloga. Esta técnica revolucionou o campo da genética de camundongo e permitiu a análise de diversos aspectos da função gênica *in vivo*, tornando possível gerar alterações genéticas específicas que variam de mutações pontuais a rearranjos cromossômicos. Utilizando este procedimento, animais transgênicos podem ser produzidos a partir de células troncoembrionárias totipotentes, as células ES, modificadas geneticamente pela introdução de um gene exógeno (transgene). Este método é utilizado com o objetivo de substituir um gene funcional por uma sequência mutada, que,

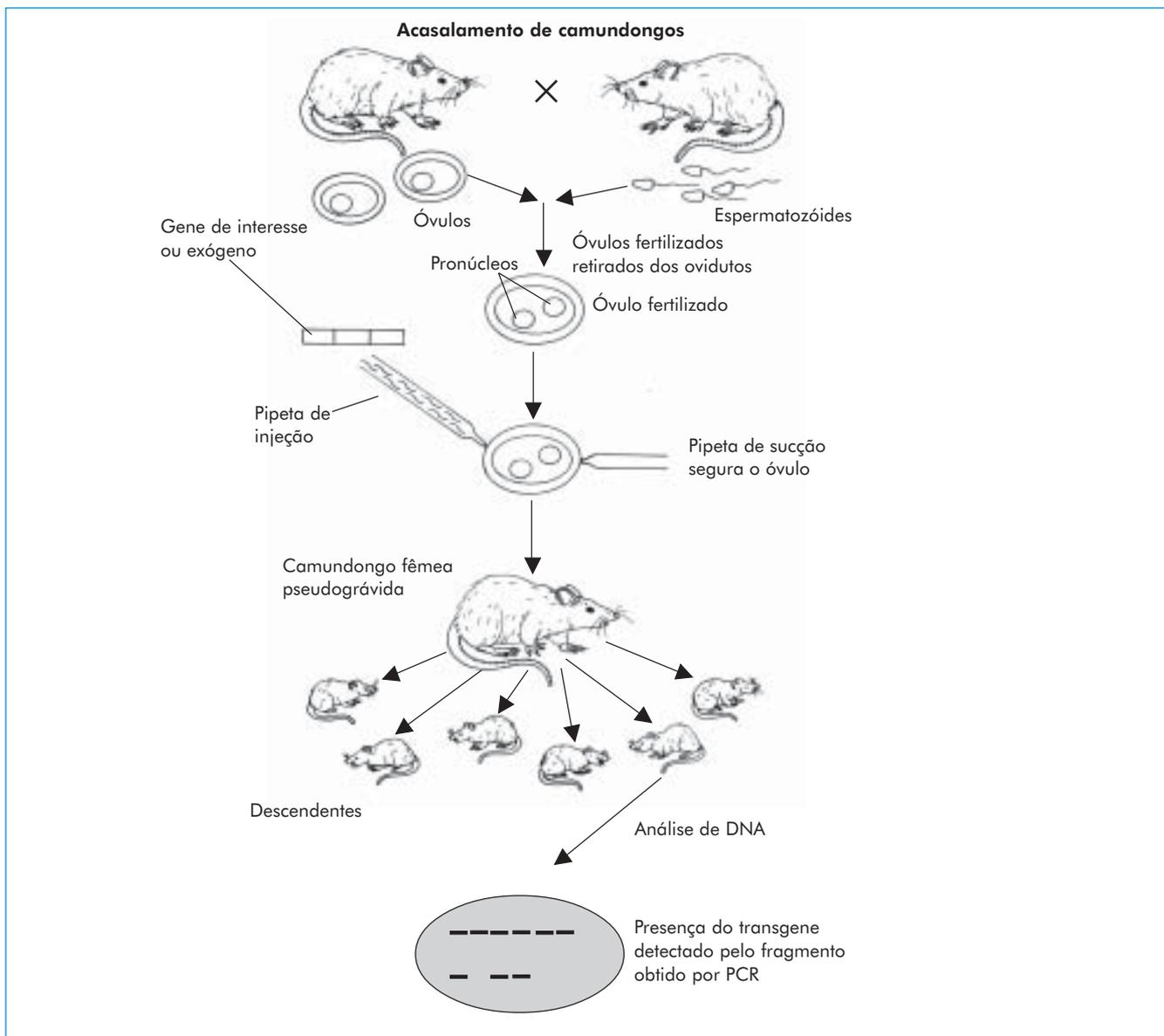


Fig. 52.3 — Esquema da geração de animais transgênicos pelo método de microinjeção pronuclear

uma vez introduzida, irá inativar o gene original. As células embrionárias totipotentes são provenientes da massa celular interna do blastocisto de camundongo com apenas cinco dias e, atualmente, podem ser obtidas comercialmente. Estas células são capazes de se diferenciar em todas as células do corpo, sendo, portanto, responsáveis pela formação do indivíduo adulto. Quando injetadas em mórulas ou blastocistos não cessam a diferenciação e contribuem para a formação do indivíduo, e o animal resultante é chamado de quimera, pois, conforme citado, contém duas linhagens de células distintas: uma originária das células totipotentes modificadas e a outra do blastocisto receptor onde as primeiras foram introduzidas. Esta técnica permite realizar mutações dentro de um gene escolhido *a priori* e assim descobrir a natureza e a extensão de sua função. Isto se tornou possível em decorrência dos trabalhos descritos em 1987 por Thomas e Capecchi que conseguiram substituir *in vitro*, ou seja, dentro das células embrionárias em cultura, uma sequência de DNA normal por uma sequência mutada⁵². Assim, é possível inativar qualquer gene, desde que sua sequência genômica seja conhecida. O gene endógeno pode ser trocado por uma construção contendo uma mutação específica ou que interrompa o gene impedindo-o de se expressar (Fig. 52.4). Esta troca é um evento que só ocorre por recombinação homóloga e de maior frequência nas células totipotentes, já que estas são células ainda totalmente indiferenciadas. A obtenção do alelo nulo, denominado *knockout*, possibilita o estudo da função gênica. Tecnicamente podemos inativar de maneira sistemática todos os genes dos quais a sequência seja conhecida e assim acessar os efeitos da ausência de sua função pelo estudo do

animal *knockout*. Até o presente, esta técnica foi amplamente aplicada em camundongos, pois é a única espécie em que se domina totalmente a cultura de células-troncototipotentes, além da espécie humana⁵³. Para outras espécies a limitação consiste justamente na dificuldade de manter as células-tronco-derivadas de embriões indiferenciadas em cultura.

Recentemente, novas técnicas de inativação específica de genes têm surgido, como o método baseado na recombinação Cre (causa recombinação) do bacteriófago P1, a qual reconhece e medeia a recombinação sítio-específica entre uma sequência de 34 pb conhecida como loxP (*locus* de crossover (*x*) em P1)²². A recombinase Cre é uma proteína de 38 kDa, e pertence juntamente com a recombinase FLP, uma enzima codificada pelo plasmídeo circular endógeno 2µm de *Saccharomyces cerevisiae*, à superfamília das integrases⁷⁵⁴. Utilizando estes sistemas de recombinação tornou-se possível induzir a inativação de um gene de forma específica em um tecido determinado com um tempo preestabelecido (Fig. 52.5).

A produção de um animal *knockout* é composta por muitas etapas, sendo que muitas são semelhantes às descritas anteriormente para a geração de animais transgênicos por adição. Normalmente utiliza-se a técnica de microinjeção para a introdução de células troncomodificadas em blastocistos receptores; entretanto, alguns laboratórios ainda utilizam o método de agregação de células tronco em blastocistos que consiste na cocultura das células-troncomodificadas com um blastocisto não modificado provocando agregação e formando um único embrião quimérico. Essa técnica dispensa a micromanipulação e praticamente não é mais utilizada devido às baixas taxas de integração nas células germinativas⁵⁹.

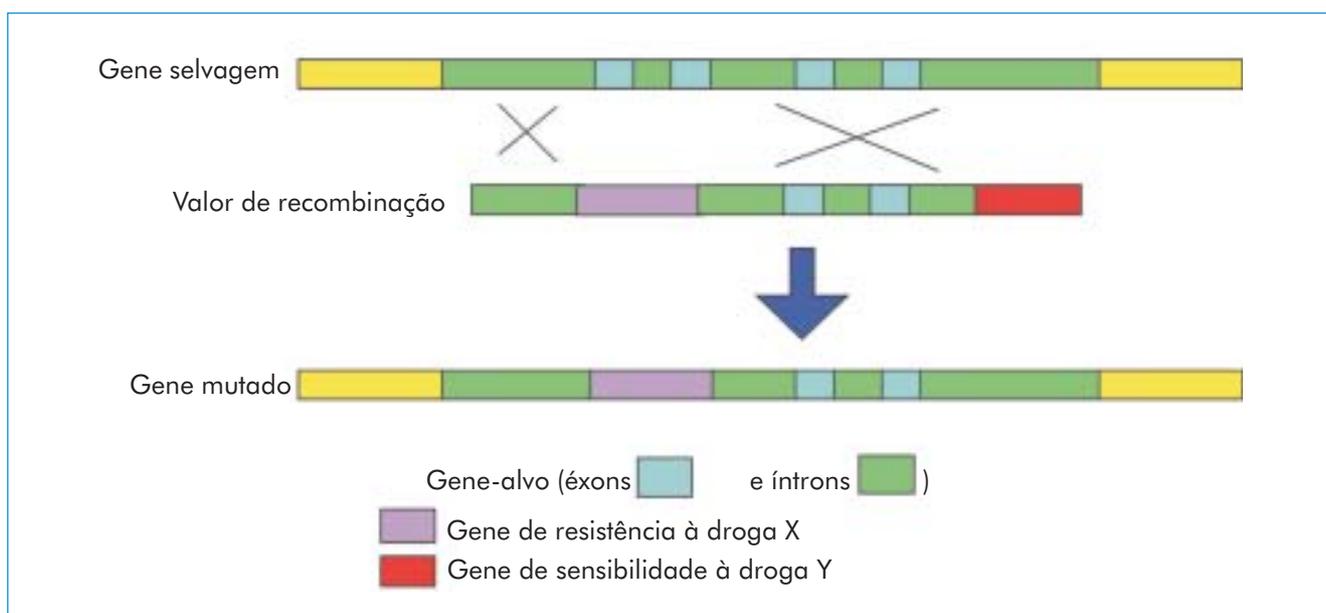


Fig. 52.4 — Esquema da construção de DNA utilizada para a geração de animais knockouts (vetor de recombinação) contendo as regiões homólogas ao gene-alvo e os genes de resistência e sensibilidade.

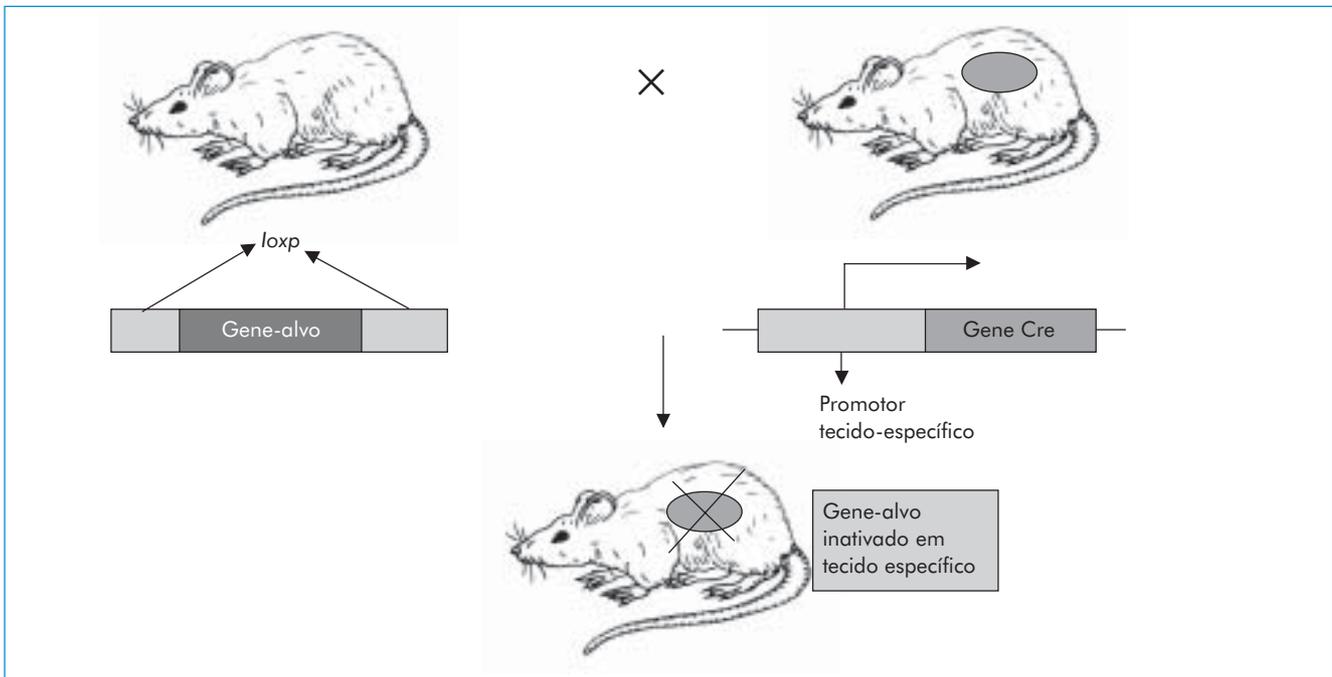


Fig. 52.5 — Esquema das construções de DNA utilizadas para a geração de transgênicos condicionais pelo sistema CRE-LoxP.

A produção de *knockout* diferencia-se principalmente por requerer embriões no estágio de blastocisto e incluir as etapas de cultura e transfecção das células totipotentes para a recombinação homóloga, como veremos a seguir:

ETAPAS DE PRODUÇÃO DO MODELO KNOCKOUT

Obtenção de células troncoembrionárias

No quinto dia de desenvolvimento o embrião de camundongo está em fase de blastocisto e é formado por cerca de 200 células indiferenciadas (massa celular interna) que darão origem aos vários tipos celulares que formarão o indivíduo adulto. Estas células podem ser cultivadas *in vitro* e mantidas indiferenciadas por tempo indeterminado na presença de fatores inibidores de diferenciação como a mitomicina. Nessas condições, é possível inserir, inativar ou modificar genes do genoma destas células através da inserção de vetores de DNA por eletroporação, infecção viral etc. Uma vez selecionadas, as células-troncomodificadas, em que o gene está inativado, são isoladas e novamente colocadas em cultura. As linhagens de células tronco de camundongo podem ser obtidas retirando-se células diretamente do blastocisto utilizando-se um micromanipulador. Atualmente é possível obter estas células comercialmente.

Construção e preparação do DNA

A construção de DNA utilizada para a inativação de um gene é chamada de vetor de recombinação. Este vetor con-

tém algumas seqüências do gene que se quer inativar e será introduzido no genoma de células-troncoembrionárias indiferenciadas *in vitro* substituindo o gene endógeno (gene alvo) através de um evento espontâneo, porém extremamente raro, denominado recombinação homóloga, que ocorre provavelmente durante duplo *crossing-over* por ação de enzimas recombinases, entre elas a proteína recA de *E. coli*.

O vetor de recombinação é composto por: — uma seqüência genômica 5' do gene-alvo; — um marcador de seleção negativa geralmente resistente à neomicina que substitui a região codificadora do gene impedindo a formação da proteína; — uma seqüência genômica 3' do gene-alvo; — a seqüência do gene da timidinaquinase (*tk*) que funciona como marcador de seleção positiva (Fig. 52.4). As duas seqüências genômicas presentes no vetor de recombinação são responsáveis pela homologia deste com o gene endógeno, o que serão decisivos durante o processo de recombinação homóloga, pois, caso contrário, o vetor seria introduzido aleatoriamente no genoma.

Inserção do vetor de recombinação e seleção das células totipotentes modificadas

A inserção do vetor de recombinação nas células-troncoembrionárias é realizada por eletroporação que consiste na exposição das células em meio de cultura a um estímulo elétrico em um eletroporador na presença do DNA linearizado e purificado. A eletroporação leva à formação de poros na membrana das células permitindo a entrada do DNA exógeno do

citoplasma para o núcleo. As células são transferidas para uma placa de cultura onde serão selecionadas para a identificação delas em que ocorreu recombinação homóloga e, portanto, o vetor de recombinação foi inserido substituindo o gene-alvo. A eletroporação produz inserção de uma cópia do vetor recombinante no genoma em cerca de 1% das células tronco em cultura.

A identificação das células modificadas é realizada com o uso de dois marcadores genéticos que permitem selecionar as células em que houve recombinação homóloga. Um dos marcadores mais utilizados é o gene *neo* que codifica a aminoglicosídeo-fosfotransferase, o qual foi inserido no vetor e que confere resistência ao antibiótico neomicina. Após crescimento celular adiciona-se geneticina, um análogo de neomicina, ao meio de cultura, e a maioria das células nas quais não houve integração do vetor ou esta foi aleatória, é sensível à droga e morre. Entretanto, as que adquiriram o vetor e consequentemente expressam o gene *neo* são resistentes à droga e permanecem vivas (seleção positiva). O outro marcador utilizado para seleção das células é o gene *tk*, que codifica para enzima timidínase do vírus herpes *simplex* que foi inserido na extremidade 3' do vetor de recombinação. Quando ocorre recombinação homóloga a seqüência do gene *tk* não se integra ao genoma por estar fora da seqüência complementar que orienta o alinhamento entre o vetor e o seu alvo. Entretanto, se a integração do vetor é aleatória as células recebem o vetor inteiro e a célula passa a expressar a enzima. Nesse caso, a aplicação da droga ganciclovir, um análogo de nucleosídeo, ao meio de cultura é mortal para as células que expressam o gene *tk*, pois a DNA polimerase utiliza este nucleotídeo não-funcional (seleção negativa). Com os dois marcadores (*neo* e *tk*), é possível selecionar células que em sua maioria apresentam a recombinação homóloga desejada. Obtém-se assim, a mutação específica e controlada do gene escolhido, confirmada pela análise de uma amostra do DNA das células. As células são mantidas em cultura e a seleção tem a duração de 10 dias até que se formam clones das células as quais são analisados por PCR quanto à presença do vetor de recombinação. Os clones positivos são desagregados e as células são injetadas nos blastocistos receptores e darão origem a animais quiméricos.

Produção de blastocistos

A escolha da linhagem de fêmeas doadoras de blastocistos (> 16 células) vai depender da origem genética das células tronco que serão utilizadas. Como a maioria das células tronco é derivada da linhagem de camundongos 129 que apresenta pelagem aguti, os blastocistos devem ser derivados de linhagem albina ou preta o que permitirá avaliar o grau de contribuição das células tronco através do quimerismo da pelagem do animal resultante. Embriões em fase de blastocisto são coletados do útero de fêmeas doadoras de 3,5 a 4,5

dias após o acasalamento. Os blastocistos são obtidos por lavagem uterina e mantidos em meio de cultura até o momento de microinjeção de células troncomodificadas. A microinjeção é realizada com o auxílio de dois micromanipuladores laterais acoplados a um microscópio invertido de alta resolução e as células tronco são microinjetadas diretamente na blastocela (cavidade interna blastocística) utilizando-se uma microagulha acoplada ao micromanipulador. Os blastocistos injetados são mantidos em cultura até o momento de transferência. Os blastocistos microinjetados são transferidos para os cornos uterinos de fêmeas receptoras pseudogravídas que são preparadas acasalando-se fêmeas em estro natural com idade mínima de 6 semanas com machos vasectomizados ou geneticamente estéreis. Várias linhagens podem ser utilizadas, entretanto, são indicadas fêmeas com cor de pelagem distinta dos blastocistos doados, o que vai garantir que qualquer animal nascido seja realmente derivado dos mesmos. No estereomicroscópio, o corno uterino é imobilizado na junção com o oviduto e com uma agulha é produzido um orifício. A agulha é retirada, a pipeta é inserida no orifício e os embriões são depositados lentamente.

Obtenção de linhagem homozigota

Conforme citado, a maioria das células-tronco disponíveis é derivada da linhagem de camundongo 129 homozigota *aguti*. Para se reconhecer os animais quiméricos pela cor do pêlo, é necessário injetar células-tronco 129 em blastocistos de linhagens albinas ou não-*aguti* homozigotas. A maioria das linhagens de células-tronco são de cariótipo masculino (XY), portanto, os blastocistos injetados darão origem a machos quiméricos⁴⁷. É indicado que todos os quimeras contendo 50% ou mais de pelagem *aguti* sejam testados para a transmissão na linhagem germinativa. Estes quimeras são acasalados com fêmeas não-*aguti* selvagens, e, uma vez que apenas um alelo das células-tronco é mutado pela recombinação homóloga, 50% dos descendentes de um quimera cruzado com uma fêmea não-*aguti* vão herdar a mutação, ou seja, apresentar pelagem *aguti*. O DNA da cauda deve ser extraído de todos os descendentes *aguti* e realizado PCR ou *Southern blot*. Os animais heterozigotos são acasalados entre si para serem obtidos 25% de homozigotos mutantes. A genotipagem é realizada nos filhotes heterozigotos dos animais quiméricos contendo células germinativas modificadas. O DNA da cauda deve ser extraído e realizado PCR ou *Southern blot* assim como para os neonatos transgênicos por adição.

APLICAÇÕES DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS

A tecnologia transgênica apresenta inúmeras aplicações em diferentes campos de atuação. Na medicina, a possibilidade de modificar o patrimônio genético de um animal tem

provocado um grande impacto no que se refere à compreensão de mecanismos fisiológicos e patológicos e ao desenvolvimento de novas terapias, produzindo efeitos no modo e na expectativa de vida do ser humano. Os processos interativos dos mamíferos vivos são extremamente complexos, sendo, portanto, muito difícil reproduzi-los *in vitro*. Os estudos utilizando animais transgênicos possibilitam a avaliação de modificações genéticas tanto na anatomia como na fisiologia de um organismo vivo, o que era impossível até muito pouco tempo. Um aspecto importante é que estes modelos são gerados para estudos específicos, o que os torna, na maioria das vezes, modelos ideais em comparação aos modelos animais convencionais. O impacto desta tecnologia também tem sido grande com relação ao uso de animais de laboratório em todo o mundo. A geração de modelos transgênicos está provocando uma redução do número de animais utilizados para experimentação de uma forma geral, além de gerar uma substituição das espécies geneticamente mais próximas ao homem, como os cães e os primatas, por animais menores geneticamente modificados contendo as características específicas que se deseja estudar. Dessa forma, a longo prazo, a redução do número de animais utilizados para se estudar doenças humanas é possível devido à maior especificidade dos modelos transgênicos desenvolvidos.

Em pesquisa básica, o uso de animais transgênicos possibilita o estudo da estrutura, regulação e função de genes. Estes animais são utilizados para se avaliar a função gênica através da observação dos efeitos causados por superexpressão, modificação ou inativação de genes no fenótipo do animal geneticamente modificado. Estudos dos mecanismos de diferenciação celular e ativação de genes específicos em diferentes fases do desenvolvimento embrionário e adulto avançaram muito após o uso de animais transgênicos nos quais um gene repórter foi adicionado para se estudar a expressão de gene dirigido por promotores específicos¹. Um exemplo é o peixe-zebra (*zebrafish*) transgênico, um excelente modelo para se estudar como os genes são ativados durante o desenvolvimento²⁸. A compreensão do desenvolvimento deste vertebrado fornece importantes informações que podem ser inferidas para o embrião humano, uma vez que o desenvolvimento embrionário de peixes e homem é bastante similar e alguns genes do desenvolvimento do peixe-zebra parecem ter equivalentes humanos com seqüências e funções semelhantes³⁵.

Em pesquisa biomédica, inúmeros modelos transgênicos foram gerados apresentando doenças similares às presentes no ser humano, como doenças cardiovasculares, auto-imunes, neurológicas, AIDS, câncer, entre outras^{15,31,37}. Estes animais são utilizados para se compreender as causas, progressão, estágios e sintomas de uma determinada doença. Animais com mutações que mimetizam as principais características de uma determinada anomalia são um passo fundamental na pesquisa das doenças genéticas. Tais modelos

permitem o exame detalhado da fisiopatologia da doença, além de servirem para delinear novas formas de tratamento, desenvolvimento de testes diagnósticos, agentes terapêuticos inovadores mais eficazes e baratos, além de terapia gênica². Várias espécies animais, como ratos, coelhos e porcos, têm sido utilizadas como modelos de doenças humanas; entretanto, o camundongo é o animal de laboratório de escolha para a manipulação genética por ser uma espécie de pequeno tamanho, fáceis manipulação e manutenção, além da disponibilidade da seqüência completa de seu genoma recentemente finalizada que mostrou grande similaridade com o homem¹⁹. Um exemplo de modelo de grande importância clínica é o *oncomice*, um camundongo desenvolvido por pesquisadores de Harvard University com predisposição ao desenvolvimento de cânceres pulmonar e linfático. Este camundongo apresenta genes defeituosos, os oncogenes, que são genes relacionados ao desenvolvimento de câncer e têm sido amplamente utilizados em todo o mundo para se testar drogas e terapias contra estes dois tipos de câncer^{4,42,56}. Outros modelos animais têm sido desenvolvidos para doenças como AIDS, doenças cardíacas, fibrose cística e diabetes. Apesar de as doenças produzidas em animais apresentarem grande similaridade com as doenças em humanos, devido às diferenças entre as duas espécies, existem algumas limitações à adequação e ao uso destes animais como modelos. Um exemplo é o camundongo gerado para desenvolver fibrose cística que apresenta uma taxa de mortalidade ao nascimento muito mais alta do que humanos acometidos pela doença. Além do mais, humanos com fibrose cística desenvolvem infecções respiratórias severas que não foram observadas nos modelos de camundongos com a doença²¹. Por este motivo, os cientistas devem ser cuidadosos com as inferências com relação à progressão e o tratamento de uma doença humana baseado em evidências observadas nos estudos com modelos de animais transgênicos.

Em indústria farmacêutica, os animais transgênicos produzidos são geralmente animais domésticos de grande porte que são utilizados como biorreatores produzindo proteínas recombinantes humanas valiosas como enzimas, hormônios e fatores de crescimento. Muitas vezes a droga administrada para o tratamento de uma determinada doença é a própria proteína que está ausente, como é o caso da diabetes melito onde as células pancreáticas não produzem a proteína insulina. Esta doença é tratada com a injeção direta de insulina obtida de um doador humano ou a partir de bactérias transgênicas geneticamente modificadas que secretam esta proteína. O problema é que, até o momento, a obtenção de proteínas para serem administradas como drogas a partir do próprio ser humano é extremamente trabalhosa e cara, e, por outro lado, proteínas humanas são por vezes muito complexas para serem sintetizadas por bactérias. Dessa forma, inúmeros estudos estão sendo realizados com o objetivo de se viabilizar a produção de proteínas humanas em grande escala por ani-

mais transgênicos. Estes animais são capazes de produzir proteínas humanas complexas no leite através da expressão dirigida de genes humanos nas glândulas mamárias. Um exemplo são as cabras transgênicas geradas para produzir uma proteína anticoagulante humana chamada antitrombina III (ATIII). A droga poderá ser administrada em pacientes indicados para cirurgia de implantação de artéria coronária¹⁶. Na Escócia, a companhia PPL Therapeutics produziu a ovelha transgênica Polly que carrega um gene humano que codifica para a proteína Fator IX. Uma vez produzida no leite, a proteína será posteriormente isolada e utilizada para se tratar doentes hemofílicos que não são capazes de produzir este importante fator de coagulação. Diferente de outros transgênicos, Polly foi produzida utilizando-se a técnica de clonagem por transferência nuclear na qual o gene do Fator IX humano foi inserido em fibroblastos fetais e, após seleção, núcleos dessas células foram transferidos para óvulos enucleados que foram transferidos para fêmeas receptoras. A técnica de clonagem foi utilizada porque através dela se produz um grupo 100% homogêneo de animais (clones) que possuem o transgene na mesma posição cromossômica, sendo portanto, todos capazes de produzir a proteína homogeneamente⁴⁸.

Em xenotransplantação, animais transgênicos serão futuros doadores de órgãos para seres humanos. Atualmente, pesquisas estão em andamento no desenvolvimento de porcos transgênicos cujos órgãos serão viáveis para transplante em humanos. Um aspecto do sistema imune humano reconhece e destrói todas as células que não possuem marcadores específicos humanos na sua superfície. Estes marcadores são proteínas de superfície celular distintas encontradas apenas em células humanas. Porcos transgênicos foram desenvolvidos os quais possuem um gene que codifica para uma proteína de superfície humana. Como resultado, estes porcos possuem órgãos contendo marcadores de células humanas, o que impede que componentes do sistema imune humano ataquem e destruam o órgão transplantado⁴⁴.

Dois grupos de pesquisadores têm estudado outra estratégia para se minimizar a rejeição de órgãos na xenotransplantação. A presença da a-1,3- galactosiltransferase na superfície de células de porco são reconhecidas pelo sistema imune humano a qual seria a primeira etapa na rejeição ao órgão transplantado. Para evitar este processo, um porco *knockout* foi gerado por clonagem no qual o gene que codifica para esta molécula está ausente^{5, 33}.

Finalmente, o aspecto mais controverso do uso desta tecnologia envolve o melhoramento genético de animais domésticos de interesse econômico em larga escala decorrente de

modificação da anatomia e fisiologia do animal como, por exemplo, aumento da massa corpórea, diminuição de gordura, resistência a doenças, maior produção de carne e leite etc. Por exemplo, porcos transgênicos foram gerados apresentando taxas de crescimento e qualidade de carne superiores. Estes porcos aproveitam a comida de forma mais eficiente e são resistentes a doenças⁵⁸. Ovelhas transgênicas foram desenvolvidas com maior produção de lã sem a necessidade de dieta rica em suplementos de aminoácidos⁹.

Com o objetivo de intensificar a produção de peixes, foram geradas espécies transgênicas do salmão do Atlântico com superexpressão do gene do hormônio de crescimento ou de outros fatores de crescimento. A taxa de crescimento destes peixes foi da ordem de 30-60% maior com relação aos mesmos peixes não-transgênicos^{6, 8}. Do mesmo modo, alguns peixes de águas geladas possuem um gene que codifica para uma proteína que impede o congelamento (*antifreeze protein*) permitindo que sobrevivam em águas com temperaturas abaixo de zero uma vez que a proteína inibe a formação de cristais nas células do sangue. Uma vez que o salmão do Atlântico não possui este gene, programas de pesquisa estão sendo realizados com o objetivo de se gerar um salmão transgênico contendo o gene da proteína *antifreeze*, para aumentar a tolerância desta espécie a águas de baixa temperatura²⁵.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de alterações genéticas desenvolvidas ao longo das últimas três décadas provocaram uma grande revolução no campo da genética animal, permitindo a análise de vários aspectos da função gênica *in vivo*. As pesquisas biomédicas baseadas nas alterações genéticas em modelos animais oferecem umas das maiores esperanças para a cura das principais doenças que ainda afligem a humanidade. O uso de animais transgênicos é central na concretização desta esperança e, além disto, oferece o potencial para o uso de um menor número de animais em experimentos mais direcionados. A utilização das modernas técnicas de transgênese hoje disponíveis tornou possível criar-se alterações que podem variar desde simples mutações a rearranjos cromossomais complexos, e mais recentemente, alterações genéticas dirigidas induzíveis em tecidos específicos e em tempos controlados. Portanto, o uso apropriado dos modelos de animais transgênicos deve propiciar as ferramentas necessárias para o desenvolvimento da ciência, com grande potencial para gerar benefícios médicos, biotecnológicos e comerciais altamente significativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amsterdam A, Lin S, Hopkins N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol* 171(1):123-9, 1995.
2. Bains W. Biotechnology for pleasure and profit. *Biotechnology (NY)* 11(11):1243-1247, 1993.
3. Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(2):353-7, 1971.
4. Chen GJ, Colombo LL, Lopez MC, Watson RR. Reduction of tumor necrosis factor production by splenocytes from v-Ha-ras oncogene-bearing mice. *Cancer Lett* 74(3):147-50, 1993.
5. Dai Y, Vaught TD, Boone J et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20(3):251-5, 2002.
6. Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY et al. Growth of domesticated transgenic fish. *Nature* 409(6822):781-2, 2001.
7. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N et al. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330(6148):576-8, 1987.
8. Du SJ, Gong ZY, Fletcher GL et al. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology (NY)* 10(2):176-81, 1992.
9. Espanion G, Niemann H. Methods of production and perspectives for use of transgenic domestic animals. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103(8-9):320-8, 1996.
10. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-6, 1981.
11. Fukamizu A. Transgenic animals in endocrinological investigation. *J Endocrinol Invest* 16(6):461-73, 1993.
12. Gandolfi F, Lavitrano M, Camaioni A et al. The use of sperm mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs *J. Reprod Fertility Abs. Series* 4-10, 1989.
13. Gardner RL. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 220(167):596-7, 1968.
14. Gavrilova, T.N. (1967) The contents of labeled DNA in nerve cells of mice of different ages after introduction of H3-thymidine in the period of embryogenesis. *Tsitologiya* 9(1):68-72.
15. Godard, A.L.B., Guénet, J. (1999) Genética de Camundongos. Modelos animais de doenças humanas. *Biociencia, Ciência & Desenvolvimento* 9:96-100.
16. Gol'dman, I.L., Kadulin, S.G., Razin, S.V. (2002) Transgenic goats in the world's pharmaceutical industry in the XXI century *Genetika* 38(1):5-21.
17. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12):7380-4, 1980.
18. Gossler A, Doetschman T, Korn R et al. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(23):9065-9, 1986.
19. Gregory, S.G. et al. *Nature* 418(6899):743-50.
20. Gridley, T. Insertional versus targeted mutagenesis in mice. *New Biol* 3(11):1025-34, 1991.
21. Grubb BR, Boucher RC. Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Ver* 79(1Suppl):S193-214, 1999.
22. Gu H, Marth JD, Orban PC. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103-6, 1994.
23. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315(6021):680-3, 1985.
24. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63(5):1099-112, 1990.
25. Hew CL, Davies PL, Fletcher G. Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1(4-5):309-317, 1992.
26. Hogan B, Constantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986.
27. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1994.
28. Houdebine LM, Chourrout D. Transgenesis in fish. *Experientia* 47(9):891-897, 1991.
29. Jaenisch R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(4):1260-1264, 1976.
30. Jaenisch R. Germ line integration of moloney leukemia virus: effect of homozygosity at the m-mulV locus. *Cell* 12(3):691-6, 1977.
31. Jaenisch R. Transgenic animals. *Science*, 240 (4858): 1468-74, 1988.
32. Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(4):1250-4, 1974.
33. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295(5557):1089-92, 2002.
34. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57(5):717-23, 1989.
35. Lawson N, Weinstein B. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248(2):307, 2002.
36. Loyer A, Zakai N, Kulka RG. Ultramicroinjection of macromolecules or small particles into animal cells. A new technique based on virus-induced cell fusion. *J Cell Biol* 66(2):292-304, 1975.
37. Meisler MH. Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet* 8(10):341-4, 1992.
38. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344(6266): 541-4, 1990.
39. Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE et al. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(23):13090-95, 2001.
40. Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1;89(15):6861-5, 1992.
41. Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Biotechnology* 24:429-33, 1982.
42. Pattengale PK, Stewart TA, Leder A et al. Animal models of human disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes. *Am J Pathol* 135(1):39-61, 1989.
43. Pesquero JB, Magalhães LE, Baptista HA, Sabatinni RA. Animais Transgênicos. *Revista Biotecnologia*, ano V, 27: 52-6, 2002.
44. Platt JL. *New Directions for Organ Transplantation*. *Nature* 392(6679 Suppl):11-7, 1998.
45. Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF et al. Genetic engineering of livestock. *Science* 244(4910):1281-8, 1989.
46. Richa J, Lo CW. Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected chromosome fragments. *Science* 245(4914):175-7, 1989.
47. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323(6087):445-8, 1986.
48. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278 (5346):2130-2133, 1997.
49. Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJ. Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* 246(4931):799-803, 1989.

50. Shastry BS. Gene disruption in mice: models of development and disease. *Mol Cell Biochem* 181(1-2):163-179, 1998.
51. Silva Jr JA, Araujo RC, Baltatu O et al. Reduced Cardiac Hypertrophy and Altered Blood Pressure Control in Transgenic Rats With the Human Tissue Kallikrein Gene. *FASEB J.* 14(13):1858-1860, 2000.
52. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3):503-512, 1987.
53. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391) 1145:7, 1998.
54. Torres RM, Kühn R. *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting* Oxford University Press, 1997.
55. Wall RJ, Pursel VG, Shamay A, Mcknight RA et al. (High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5): 1696-700, 1991.
56. Webster, J. Animal genetics — of pigs, oncomice and men. *Trends Biotechnol* 11(1):1-2, 1993.
57. Wei C, Willis RA, Tilton BR et al. Tissue-specific expression of the human prostate-specific antigen gene in transgenic mice: implications for tolerance and immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(12):6369-74, 1997.
58. Wheeler MB, Walters EM. Transgenic technology and applications in swine. *Theriogenology* 56(8):1345-69, 2001.
59. Wood SA, Pascoe WS, Schmidt C et al. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(10): 4582-5, 1993.
60. Zarraga, A.M., Danishefsky, K., Deshpande, A et al. (1986) Characterization of 5'-flanking region of heart myosin light chain 2A gene. Structural and functional evidence for promoter activity. *J Biol Chem* 261(29):13852-13860.
61. Zhang, Y., Proença, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. (1994) Posicional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

JOÃO BOSCO PESQUERO

Departamento de Biofísica

Rua Botucatu 862, 7º andar — CEP: 04023-062– São Paulo-SP

Tel.: (11) 5572-4583 — Fax: (11) 5571-5780 — *E-mail*: jbpsesq@biofis.epm.br

Títulos Universitários/Formação Acadêmica

- Química: Bacharel em Química pela USP — São Paulo em 1986.
- Mestrado: Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, 1989.
- Doutorado: Ph.D. em Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, 1992.
- Pós-doutorado: Instituto de Farmacologia da Universidade de Heidelberg, Alemanha, 1992-1993.
- Pós-doutorado: *Max-Delbrück Center fur Molekulare Medizin*, Alemanha, 1993-1996.
- Titularidade: Concurso Professor Adjunto do Departamento de Biofísica da UNIFESP, 1996.

Funções Atuais

- Professor Adjunto do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.
- Vice-chefe do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo desde junho de 1999.
- Diretor Técnico-científico do Centro para o Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME)

- Chefe do Laboratório de Animais Transgênicos do CEDEME

Assessorias

- Revistas científicas: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, American Journal of Obstetrics and Gynecology
- Assessor *ad hoc* das seguintes agências: CNPq, CAPES, FAPESP, DAAD, Academia Brasileira de Ciências.
- Resumo da Produção Acadêmica e Científica

Resumo da Produção Acadêmica e Científica**Publicações**

Periódicos indexados (PubMed), 42
Capítulos de Livros, 2
Patente, 2

Formação e Seleção de Pessoal

Teses orientadas/mestrado, 6
Teses orientadas/doutorado, 3
Teses em andamento, 12

HELOÍSA ALLEGRO BAPTISTA

Universidade Federal de São Paulo

Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia — UNIFESP

Rua Botucatu, 862 — CEDEME — Vila Clementino — CEP: 04023-062 — São Paulo-SP

Tel.: (11) 5576-4526

Títulos Universitários/Formação Acadêmica

- 1997–2002— Doutorado em Biologia Molecular pela EPM — UNIFESP. Pesquisa desenvolvida no Departamento de Bifísica sob orientação do Prof. Dr. João Bosco Pesquero na área de Biologia Molecular do Sistema Caliceína-Cininas. *Título da tese*: Regulação da transcrição do gene do receptor B2 de bradicinina de rato: identificação de um elemento silenciador.
- 1988–1992 — Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Organização Santamarensense de Educação e Cultura — OSEC. Atual Universidade de Santo Amaro — UNISA. São Paulo — SP.

Experiência Profissional

- 1993-Atual — Bióloga admitida por concurso público em 14 de março de 1993 pela Universidade Federal de São Paulo — UNIFESP na categoria Técnico Administrativo de Nível Superior.
- 1997- Atual — Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia — CEDEME — EPM — UNIFESP. *Função*: Coordenadora do Laboratório de Produção de Animais Transgênicos e Nocautes e do Laboratório de Cultura de Células Tronco (ES Cells).
- 1995-1997 — Laboratório de Reprodução Humana e Fertilização *in Vitro* do Hospital Alemão Oswaldo Cruz — HAOC. *Função*: Embriologista — Participou como sócia da equipe titular no grupo HR — Centro Diagnóstico de Andrologia e Ginecologia LTDA.
- 1992-1997 — Laboratório de Urologia — Reprodução Humana, Setor de Reprodução Humana, Disciplina de Urologia, Depto de Cirurgia, EPM — UNIFESP. *Função*: Embriologista

Atividades Didáticas

- Responsável pelas aulas teórico-práticas ministradas aos alunos do primeiro ao quarto anos do curso de Medicina oferecido pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia — CEDEME. Período: 01/02/1999 — atual. Temas: “Animais Transgênicos: Princípios, Técnicas e Aplicações” e “O uso de animais transgênicos para o estudo do Sistema Cardiovascular, Inflamação e Câncer”.
- Responsável pelas aulas teórico-práticas ministradas aos alunos do sexto ano do curso de Medicina e aos médicos residentes das Disciplinas de Urologia e Ginecologia da UNIFESP-EPM. Período: 10/01/1994 — 30/07/1997. *Tema*: “O Laboratório de Reprodução Humana — Diagnostico Laboratorial e Fertilização *in vitro*”.

Estágios e Cursos

- *Max Delbrück-Centrum fur Molekulare Medizin — Campus Berlin-Buch*, Berlin-Alemanha. Programa CAPES-PROBRAL de colaboração Brasil-Alemanha entre os orientadores Prof. João Bosco Pesquero (Brasil) e Prof. Michael Bader (Alemanha). (19/08/00 — 30/11/01)
- Desenvolvimento de dois projetos de pesquisa na área de Biologia Molecular do Sistema Caliceína-Cininas envolvendo a geração de dois modelos animais geneticamente modificados para análise funcional de hormônios cardiovasculares.
- Treinamento da tecnologia para a produção de animais nocautes.
- *Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular* da Universidade de Buenos Aires, Argentina.
- Treinamento das técnicas relacionadas à produção de animais transgênicos. (31/05/1999 — 18/06/1999)
- Curso “*Producción y Análisis de Animales Transgênicos*” (tendo sido um dos 5 brasileiros selecionados pelo Ministério da Ciência e Tecnologia Brasil e pelo Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia. (07/12/1998 — 18/12/1998)

Cursos, aulas e trabalhos apresentados em Congressos

- 4º Congresso Mundial de Ciência em Animais de Laboratório / 8º Congresso Brasileiro de Ciência de Animais de Laboratório — COBEA, Goiânia-GO, 18-21 de Novembro, 2002. Minicurso: “Animais transgênicos”.
- 2ª Jornada de Biomedicina das Faculdades Metropolitanas Unidas -uniFMU, São Paulo-SP, 29 de novembro, 2002. “Animais transgênicos: Princípios, Técnicas e Aplicações”.
- 3ª semana de Biologia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas-Centro Universitário Federal (Efoa-Ceufe), Alfenas-MG, 27 de setembro, 2002. “Animais transgênicos”.
- *III International Symposium on Vasoactive Peptides*, Belo Horizonte-MG, 1999. “Transcriptional regulation of the rat bradykinin B2 receptor gene: identification of a silencer element” — Poster.
- XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental — FESBE, Caxambu-MG, 1998. “Regulação da transcrição do gene do receptor B2 de bradicinina” — Poster.
- XXVI Congresso Brasileiro de Urologia, Blumenau-SC, 1997.
- “Concentração de espermatozoides e o desenvolvimento de pré- embriões humanos *in vitro*”. Tema Livre.
- “A concentração de espermatozoides após *swim-up* e a fertilização *in vitro*”. Tema Livre.
- “Avaliação morfológica dos pré-embriões no programa de fertilização *in vitro* da UNIFESP”. Tema Livre

- “Extração cirúrgica dos espermatozóides do testículo (TESE)” — Vídeo
 - XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Humana, Natal-RN, 1996.
 - “Endocervicite e *Chlamydia Trachomatis* em Infertilidade”. Tema Livre.
 - “Teste de Kremer: Normozoospermia X Oligozoospermia” — Poster.
- Publicações Nacionais e Internacionais**
- Pessoa L.G., Silva I.D.G., Baptista H.A., Pesquero J.L., Paiva A.C.M., Bader M., Pesquero J.B. *Molecular structure and alternative splicing of the human carboxypeptidase M gene*. *Biological Chemistry*. 383(2): 263-9, 2002.
 - Heloisa A. Baptista, Maria C.W. Avellar, Ronaldo C. Araujo, Jorge L. Pesquero, Joost P. Schanstra, Jean L. Bascands, Jean P. Esteve, Antonio C. M. Paiva, Michael Bader and João B. Pesquero. *Transcriptional Regulation of the Rat Bradykinin B2 Receptor Gene: Identification of a Silencer Element*. *Molecular Pharmacology*. 62(6): 1344-55, 2002.
 - João Bosco Pesquero, Luiz Edmundo de Magalhães, Heloisa Allegro Baptista e Regiane Angélica Sabatinni. *Animais Transgênicos*. *Revista Biotecnologia*, ano V, 27: 52-6, 2002.
 - Heloisa Allegro Baptista, Clélia Rejane Bertoncinni e João Bosco Pesquero. *Animais Transgênicos: Princípios e Aplicações*, Manual para Bioteristas do COBEA. No prelo.