

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA O  
ESTUDO DE TERAPIAS CELULARES**

**CRISTINA ARAGÃO SILVA**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**CRISTINA ARAGÃO SILVA**

**PRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA O  
ESTUDO DE TERAPIAS CELULARES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fiocruz-Ba, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

Co-orientadora: Dra. Milena B. P. Soares

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**

“PRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA  
O ESTUDO DE TERAPIAS CELULARES”

**CRISTINA ARAGÃO SILVA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

---

**Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Farre Valle**

---

**Dr<sup>a</sup> Fabienne Petitinga de Paiva**

Dedico a meus pais, amigos e orientadores, pelo apoio, incentivo e aprendizado

## AGRADECIMENTOS

1. Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, pela orientação e oportunidade cedida para a realização desse trabalho.
2. À Dra Milena Botelho Pereira Soares, pela co-orientação nesse trabalho e pela efetiva participação na minha formação científica.
3. Ao coordenador do Biotério da Fiocruz-Ba, Vitor Valério Maffili, pela ajuda disponibilizada quanto à aquisição de animais, materiais, artigos, ideias e formação acadêmica.
4. Ao laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (Incor) e sua equipe, em especial Gustavo José Justo da Silva e Renata Carmona, pelo fornecimento das construções contendo os vetores lentivirais sob controle de diferentes promotores e, pela disponibilidade em elucidar todas as dúvidas referentes aos procedimentos de produção desses animais e genotipagem dos mesmos.
5. Ao Prof. Dr. Charles Babinet (1939-2008), cientista do Instituto Pasteur pioneiro na transgenia animal, pelo treinamento nos primeiros ensaios desse trabalho, contribuindo de maneira exponencial para minha prática.
6. À Dra Genevieve Tavernier, pelo treinamento no que diz respeito à transgenia de camundongos e microinjeção de células em blastocistos.
7. Aos colegas e amigos do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia e do Biotério da Fiocruz-Ba, pelo companherismo, ajuda e amizade, em especial Ricardo Santana de Lima, pela ajuda durante os procedimentos de microinjeção dos zigotos.
8. Aos meus pais, pelo apoio constante, durante todos esses anos, proporcionado a mim um convívio pacífico, fraternal e definitivamente essencial para minha formação moral e acadêmica.
9. Aos meus amigos, por estarem sempre presentes, me apoiando nas dificuldades e sorrindo nos momentos de alegria.
10. À Fiocruz-Ba pelo fornecimento da bolsa de estudo durante os anos de 2007 a 2009.

..."enquanto houver alguém com fé, haverá esperança, enquanto houver a fé atuante, haverá misericórdia, enquanto existir o pulsante que vibre na fé, haverá solidariedade, enquanto hinos forem cantados em homenagem à fé, haverá alegria, enquanto uma criança sorrir ou chorar, mas estiver sob o abrigo da fé, haverá futuro, e nós confiaremos neste futuro, porque também temos fé. Eis, portanto, a força propulsora da vida espiritual: a fé, fé-remédio, fé-trabalho, fé-ideal"

Dr. Bezerra de Menezes

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1 DESENVOLVIMENTO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS	19
2.1.1 Definição do termo transgênico	19
2.1.2 Histórico dos primeiros camundongos transgênicos produzidos	20
2.1.3 Metodologias disponíveis para o desenvolvimento de camundongos transgênicos	25
2.1.3.1 Adição gênica ou modelo de superexpressão de um gene	26
2.1.3.1.1 Microinjeção pró-nuclear	28
2.1.3.1.2 Vetores virais	32
2.1.3.1.3 Interferência por RNA	36
2.1.3.1.4 Transgênese via utilização de transposons	40
2.1.3.1.5 Transferência de genes mediada por espermatozóides	41
2.1.3.1.6 Transferência de segmentos cromossômicos	45
2.1.3.1.7 Transferência nuclear de células geneticamente modificadas	47
2.1.3.2 Modificação genética dirigida	50

2.2	PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE	53
2.3	APLICAÇÕES DA TRANSGENIA ANIMAL	54
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>58</b>
5.1	VETOR LENTIVIRUS	58
5.2	ANIMAIS UTILIZADOS	60
5.3	SUPEROVULAÇÃO	61
5.4	COLETA DOS ZIGOTOS	62
5.5	SELEÇÃO E CULTIVO DOS EMBRIÕES	65
5.6	MICROINJEÇÃO NO ESPAÇO PERIVITELINO	67
5.7	TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES	68
5.8	GENOTIPAGEM	70
5.9	FENOTIPAGEM	72
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>74</b>
6.1	COLETA E MICROINJEÇÃO DE EMBRIÕES	74
6.2	GENOTIPAGEM E FENOTIPAGEM DOS FILHOTES	78
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BACS	Bacterial artificial chromossomes
CMV	Citomegalovírus
dsRNA	Double strand RNA
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GFP	Green fluorescent protein
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
LH	Hormônio luteinizante
LTRs	Long terminal repeats
M-MuLV	Vírus da leucemia murina de moloney
OGM	Organismos geneticamente Modificados
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA interference
SGMT	Transferência de genes mediada por espermatozóides
shRNAs	Hairpin structures RNA
siRNA	Small interfering RNA
SV40	Simian Virus 40
WRE	Elemento regulatório pós transcricional do vírus da hepatite
YACs	Yeast artificial chromossomes

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Linhagens de camundongos utilizados no estudo	61
Tabela 2 Resposta das fêmeas ao tratamento superovulatório	75
Tabela 3 Número de estruturas coletadas das fêmeas superovuladas em função da linhagem utilizada	75
Tabela 4 Número de estruturas viáveis após a microinjeção subzonal	76
Tabela 5 Número de animais nascidos após microinjeção subzonal sob controle de diferentes promotores	78
Tabela 6 Número de animais genotipados positivos para GFP em função dos diferentes promotores	79
Tabela 7 Número de embriões microinjetados em função dos diferentes promotores	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho esquemático da microinjeção pronuclear em embriões de camundongos	31
Figura 2 Injeção subzonal de vetores lentivirais para geração de animais transgênicos	35
Figura 3 RNA interference	39
Figura 4 Espermatogênese	43
Figura 5 Anatomia do testículo e epidídimo	43
Figura 6 Injeção intracitoplasmática de espermatozóide de camundongos em um oócito na metáfase II	46
Figura 7 Diagrama da clonagem de células somáticas em camundongos	49
Figura 8 Recombinação homóloga	52
Figura 9 Diagrama do vetor lentiviral FUGW usado pra gerar camundongos transgênicos sob controle do promotor humano da ubiquitina-C	59
Figura 10 Coleta do oviduto	63
Figura 11 Disposição das microgotas para coleta dos zigotos	64
Figura 12 Desenho esquemático e fotografia de uma ampola da tuba uterina contendo os zigotos envoltos nas células do Cummulus oophorus	65
Figura 13 Desnudamento dos zigotos	65
Figura 14 Embriões viáveis	66
Figura 15 Transferência dos embriões	69

Figura 16 Diagrama esquemático do processo de produção dos animais transgênicos efetuado nesse estudo	70
Figura 17 Zigotos da linhagem C57Bl/6 duas horas após a microinjeção subzonal com vetores lentivirais	74
Figura 18 Revelação do gel de agarose a 2% de 9 animais para verificar a integração do GFP no genoma	78

## RESUMO

A transferência de genes mediada por vírus, em especial pelos vetores lentivirais, é atualmente reconhecida como um eficiente sistema de transmissão de genes, resultando em altas taxas de animais fundadores carregando o transgene. Menos invasiva para os embriões, mais custo-efetivo e tecnicamente menos exigente, optamos por essa metodologia para gerar camundongos transgênicos expressando a proteína fluorescente verde em diferentes órgãos e tecidos, para subsequente uso em terapia celular. Sob controle de três promotores diferentes, ubiquitina-C, que controla a expressão da proteína nos embriões e em todos os tecidos do camundongo adulto, da alfa-miosina cardíaca, que direciona a expressão no coração, e da FmTie, que controla a expressão apenas em células endoteliais de vasos, os zigotos foram microinjetados no espaço subzonal e transferidos para fêmeas pseudogestantes. Dos 31 animais nascidos, 22 animais (72%) apresentam o transgene integrado em seu genoma. Entretanto, nenhum deles expressou a proteína fluorescente verde. Como a inserção no genoma é aleatória, o efeito de posição frequentemente observado pode afetar a expressão do transgene e de genes endógenos, além de interromper estes últimos – mutagênese insercional – levando ao chamado silenciamento gênico. Desta forma, estudos subsequentes devem ser efetuados a fim de solucionar essa ausência de expressão dos transgenes inseridos no genoma dos camundongos fundadores, viabilizando, conseqüentemente, todo o processo de desenvolvimento de camundongos transgênicos.

## ABSTRACT

Gene transfer mediated by viruses, in particular by vectors lentivirais, is now recognized as an efficient system of gene transmission, resulting in high rates of founder animals carrying the transgenesis. Less invasive for the embryos, more cost-effective and technically less demanding, we choose this methodology to generate transgenic mice expressing the green fluorescent protein in different organs and tissues for subsequent use in cell therapy. Using three different promoters as control: ubiquitin-C, which controls the expression of the protein in embryos and in all tissues of adult mice; the alpha-cardiac myosin, which directs the expression in the heart, and FmTie, which controls the expression only in endothelial cells of vessels; the zygotes were microinjected in subzonal space and transferred to pseudopregnancy females. 22 animals (72%) of 31 animals born, have integrated the transgene in its genome. However, none of them expressed the green fluorescent protein. How the insertion in the genome is random, the effect of position usually observed may affect the expression of the transgene and of the endogenous genes, stopping them - insertional mutagenesis - leading to genic silencing.

Subsequent studies should be done to solve this lack of expression of the transgenesis inserted into the genome of founder mice, enabling the whole process of development of transgenic mice.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a ciência biológica busca entender como funcionam os seres vivos, quer sejam organismos dotados de uma maquinaria celular mais simples, como as bactérias, bem como seres mais complexos, como os mamíferos. Para compreender a função de determinado órgão ou tecido, a metodologia científica utilizada na época consistia em remover ou inativar um órgão ou tecido objeto de análise em animais e, verificar as modificações que poderiam ser evidenciadas no organismo em questão como decorrência dessa prática (OLIVEIRA DOS SANTOS, 1999).

A descoberta de que a molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) contida nas células era responsável pelo armazenamento da informação genética, permitindo durante o processo de replicação celular a sua transmissão à progênie, revolucionou as ciências biomédicas, especialmente no entendimento de como os genes podem controlar o desenvolvimento dos seres vivos (PEREIRA, 1998).

A informação genética que o DNA contém é expressa indiretamente através de outras moléculas: o DNA direciona a síntese de RNAs específicos e moléculas de proteínas, as quais por sua vez delimitam as propriedades físicas e químicas de uma célula (ALBERTS et al., 1994). A leitura das seqüências das bases nitrogenadas ligadas às moléculas de açúcar e fosfato encadeando duas longas fitas dispostas em um formato helicoidal especifica a seqüência de aminoácidos e, por conseguinte, das proteínas por ela codificadas. Assim, a seqüência de nucleotídeos de um gene determina a seqüência de aminoácidos de uma proteína.

A partir de tal descoberta, o progresso científico nas ciências biomédicas se deu em torno dos estudos da função e regulação gênica, em detrimento do seu foco inicial de estudo (órgãos, tecidos e células). Entretanto, compreender a função de uma proteína é uma tarefa extremamente complexa e laboriosa. Uma estratégia seria induzir uma alteração em uma base ou um códon de um gene, o que conseqüentemente irá alterar a proteína equivalente, possibilitando gerar animais geneticamente modificados para o estudo dos possíveis efeitos dessas alterações (ausência ou disfunção de uma proteína, por exemplo) sobre os parâmetros fisiológicos do organismo.

Esse processo metodológico de introduzir intencionalmente no genoma de um animal uma seqüência de DNA exógeno efetuada por técnicas de DNA recombinante, a qual irá conferir ao animal uma nova característica hereditária, constitui a transgenia animal. O maquinário celular responsável pelo processo de codificação genética do DNA em proteínas é similar em todos os organismos vivos, o que possibilita criar um organismo transgênico em laboratório que possua genes de outras espécies (PESQUERO et al., 2007).

Desde o começo da utilização da tecnologia de transgênese, o camundongo vem emergindo como uma importante escolha de um sistema *in vivo* para estudos biomédicos. Características inerentes a espécie como, pequeno porte, fácil manipulação e manutenção, curto ciclo reprodutivo (SANTOS, 2002), além da disponibilidade da seqüência completa do seu genoma e sua grande similaridade com o homem (GREGORY et al., 2002), fazem do camundongo o animal de laboratório de escolha para a manipulação genética.



A necessidade crescente de se obter modelos genéticos modificados para o estudo e resolução de problemas científicos cada vez mais específicos, convergiu para o desenvolvimento potencial de técnicas de transgênese animal que possibilitem a expansão na produção e desenvolvimento de novos modelos animais. Existem vários métodos disponíveis para a geração de um animal transgênico e, o método a ser empregado depende do tipo de modificação genética que se deseja realizar: introdução, modificação ou inativação de um gene.

Na adição gênica e/ou superexpressão de genes, é inserido no genoma do animal uma ou várias cópias de um gene de interesse, exógeno e/ou endógeno, de forma aleatória. Há várias técnicas sendo utilizadas para o desenvolvimento de animais transgênicos por adição gênica, dentre elas a microinjeção pronuclear de embriões (GORDON, 1998), a transferência de DNA mediada por espermatozóide (HAMRA et al., 2002), o uso de transposons (GEURTS et al., 2006), a infecção dos zigotos por vetores lentivirais (LOIS et al., 2002) e a agregação ou injeção de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (NAGY & VINTERSTEN, 2006), além da transferência nuclear de células geneticamente modificadas (LEE et al, 2005) e de segmentos de cromossomos - cromossomos artificiais (MOREIRA et al., 2007).

Diferentemente da adição gênica, a modificação genética dirigida permite produzir animais com alterações específicas e controladas no genoma, mediante modificação *in vitro* de células-tronco embrionárias, por um processo denominado recombinação homóloga. Tal metodologia gera modelos *knockout* (inativação de um gene endógeno) ou mesmo modelos denominados *knockin*

(o gene endógeno é retirado do genoma e substituído por outro com uma pequena modificação).

Diferentes graus de sucessos são obtidos com cada uma dessas metodologias e, diante do amplo horizonte que essa ferramenta biotecnológica proporciona, sua aplicabilidade em vários campos das ciências biomédicas, incluindo na medicina regenerativa, implica em grandes avanços nessa área.

A medula óssea possui células-tronco pluripotentes que, em resposta a agressões teciduais, migram pelo sangue periférico em destino ao tecido lesado, diferenciando-se e proliferando-se em células com capacidade funcional normal (ORLIC et al., 2002). Sob este contexto, para a melhor compreensão dos mecanismos de recrutamento e diferenciação dessas células em modelos experimentais sujeitos a doenças degenerativas, o desenvolvimento de animais transgênicos expressando um marcador constitui uma importante ferramenta para terapia celular regenerativa (KISSEBERTH et al., 1999).

Experimentos que envolvem o transplante de células e tecidos requerem, conseqüentemente, métodos para identificar subpopulações *in vivo* que podem não ser distinguidos por critérios morfológicos (ROSSANT & SPENCE, 1998). Desta forma, a manipulação genética dos camundongos visando expressar uma proteína marcadora facilitaria o estudo dos mecanismos de migração e diferenciação das células-tronco em tecidos lesados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DESENVOLVIMENTO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

#### 2.1.1 Definição do termo transgênico

Motivos de grandes debates éticos, culturais e científicos nos últimos anos, os termos “transgênico” e “organismo geneticamente modificado” referem-se, respectivamente, a organismos em cujo genoma foi inserido, deletado ou mutado artificialmente uma seqüência de DNA (RICHARDSON et al., 1997), ou que seu patrimônio genético tenha sido submetido a qualquer alteração planejada e efetuada pelo homem (RUMPF, 2005).

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, segundo a Lei nº 8.974, define os organismos geneticamente modificados (OGM) como organismos cujo material genético (DNA/RNA) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. Em outras palavras, o organismo cujo genoma foi artificialmente manipulado pela introdução, modificação ou deleção de um gene qualquer e, cuja modificação alterou as células somáticas e germinativas de tal forma que essa modificação é transmitida aos seus descendentes, constitui um organismo transgênico (FUKAMIZU, 1993).

De maneira homóloga, o termo transgênico, abrange diferentes tipos de modelos animais: o transgênico por adição ou modelo de superexpressão de um gene, no qual várias cópias de um gene endógeno ou de outra espécie são adicionados ao genoma de forma aleatória e, os modelos *knockout* e

*knockin*, cujo gene endógeno é inativado ou previamente modificado e substituído no genoma, respectivamente (BAPTISTA et al., 2008).

### 2.1.2 Histórico dos primeiros camundongos transgênicos produzidos

Modelos de camundongos para doenças humanas têm sido usados, por longas décadas, para explorar a base genética do início e progressão de uma doença (COOK et al., 2006). Os únicos modelos animais disponíveis antes do aparecimento das técnicas de biologia molecular para a análise da regulação e função dos genes, bem como para o entendimento dos sistemas biológicos dos mamíferos, eram os mutantes espontâneos. A partir de um fenótipo patológico ou anormal diferente do animal convencional, surgiam as suspeitas na identificação do gene responsável por aquela alteração (PROLLA et al., 1998).

Com o surgimento das técnicas de biologia molecular e da engenharia genética, tornou-se possível manipular o DNA com o objetivo de alterar o genoma de forma controlada. Sob este contexto, as metodologias existentes para produzir modelos transgênicos, representam uma excelente ferramenta biotecnológica tanto para fins comerciais, como para a pesquisa básica e clínica (BAPTISTA et al., 2008).

O grande obstáculo na época era obter mutações específicas em células sexuais (gametas) de um animal vivo, pois é necessária a transmissão dessas alterações à prole. Uma vez que um embrião de camundongo desenvolve-se a partir da fecundação de um óvulo com um espermatozóide, na

ampola da tuba uterina da fêmea e, as sucessivas divisões celulares resultam em uma estrutura denominada blastocisto (KISPERT & GOSSLER, 2004), Richard L. Gardner, em 1968, isolou células de um embrião de camundongo e as injetou em blastocistos de outro camundongo. Com a inovulação em fêmeas pseudoprenhas, estes geraram camundongos quiméricos com células vindas dos dois embriões, demonstrando que a manipulação *in vitro* dos embriões era uma prática necessária para o êxito da transgenia.

A manipulação de moléculas de DNA e RNA recombinantes está longe de ser uma novidade. Cohen e colaboradores conseguiram, na década de 70, construir um plasmídeo biologicamente funcional que, quando inserido na bactéria *Escherichia coli*, modificaram-na geneticamente (COHEN et al., 1973). Na mesma década foi desenvolvido um novo método em que a informação genética contida no DNA do SV40 (Simian Vírus 40) poderia ser inserida de forma estável e hereditariamente no genoma de várias células de mamíferos (JACKSON et al., 1972).

Em 1974, Rudolf Jaenisch e Beatriz Mintz, após injetarem o vírus SV40 na cavidade blastocística de embriões de camundongos, detectaram o material viral exógeno em diversos tecidos dos camundongos gerados. Todavia, não foi observada a integração do gene exógeno às células germinativas, pois não se verificou a transmissão aos seus descendentes.

Posteriormente, ao infectarem embriões de camundongos com retrovírus da leucemia murina de moloney (M-MuLV), Jaenisch e colaboradores, em 1975, verificaram a integração do DNA exógeno nas células germinativas, o que foi verificado com a transmissão dessa alteração genética aos seus descendentes (JAENISCH, 1976). Entretanto, apesar desses

avanços, ainda era um desafio introduzir em animais um gene específico, em detrimento de uma seqüência viral sem função.

Estudos posteriores possibilitaram contornar esse desafio, mediante a introdução da técnica de microinjeção pronuclear em embriões recém fertilizados, usando uma construção viral, gerando camundongos transgênicos (GORDON et al., 1980). Entretanto, não foi observada a transmissão dessa alteração aos seus descendentes. Esse método é tão eficiente que continua sendo utilizado por muitos pesquisadores.

Subsequentemente, diversos grupos desenvolveram camundongos contendo transgenes funcionais, expressando naturalmente as proteínas por ele induzidas em células específicas. Sob esse contexto, Palminter e colaboradores caracterizam em 1982, a primeira linhagem de camundongos transgênicos produzidos pela técnica de microinjeção pronuclear. Nesse estudo, eles construíram um transgene contendo o promotor do gene da metalotioneína I, fusionado ao gene estrutural do hormônio do crescimento de ratos que foram microinjetados em pronúcleos de embriões de camundongos e transferidos para fêmeas pseudoprenhas. Dos vinte e um camundongos nascidos, sete carregavam o transgene e destes, seis cresceram significativamente, atingindo um tamanho duas vezes maior que os irmãos não transgênicos.

À medida que eram desenvolvidos os primeiros animais provenientes da transgenia, uma outra descoberta marcou essa época. Em 1981, Evans e Kaufman isolaram células-tronco embrionárias, células capazes de gerar qualquer tipo de tecido de um embrião e, em 1986, Glossler e colaboradores conseguiram transmitir a animais quiméricos as mutações aleatórias induzidas

no período de cultura, quando microinjetadas em blastocistos, provando que tais células eram capazes de gerar um indivíduo completo.

Entretanto, o ideal seria a mutagênese induzida e específica de um só gene. Em 1987, Thomas e Capecchi conseguiram gerar mutações sítio-específicas em células-tronco embrionárias, por um processo denominado recombinação homóloga, onde um gene específico poderia ser modificado ou mesmo inativado em cultura. Essa descoberta partiu de um estudo sobre a integração de transgenes ao genoma de células de mamíferos mantidas em cultura. Ao injetar cópias de um mesmo vetor transgene no núcleo das células embrionárias, grande parte delas eram ligadas entre si, em cadeia, com as seqüência de base na mesma orientação. Portanto, as células possuíam de um mecanismo para organizar mais de uma cópia desse vetor, em uma determinada ordem, antes de sua integração aleatória.

A recombinação homóloga demonstrou então que poderia ser utilizada para induzir mutações específicas em células tronco embrionárias em cultura e, possibilitou, em 1989, a obtenção dos primeiros modelos *knock out* de camundongos por Schwartzberg e colaboradores, confirmando a premissa de que era viável a transmissão de uma mutação introduzida em gene para células germinativas por recombinação homóloga.

Por conseguinte em 1998, Shastry produziu os primeiros modelos *knock in* utilizando a mesma premissa, na qual um gene de interesse é modificado em células tronco embrionárias em cultura e, posteriormente integrado no genoma de camundongos.

Orban e colaboradores desenvolveram um método de modificar especificamente o genoma de mamíferos *in vivo*, os chamados *knock out*

condicional. A técnica fundamenta-se no uso de um Sistema de Recombinação CRE/loxP, a qual permite eliminar um gene endógeno ou um transgene, assim como ativar um transgene inserido no genoma de forma controlada, isto é, em um tecido ou estágio de desenvolvimento específico.

Os avanços biotecnológicos nas técnicas de manipulação genética sucederam-se de forma exponencial nos últimos anos. Atualmente é possível verificar uma enorme variedade de organismos cujo genoma foi intencionalmente modificado. Fungos (ANAGNOSTAKIS et al., 1998), bactérias (CIABATTINI, 1998), vermes (ZHANG et al., 2008), plantas (DAI et al. 2008), e animais (POPOVA, et al., 2004). Dentre estes, o camundongo é o mais utilizado em pesquisas, por apresentar vantagens que lhe são favoráveis a sua manipulação laboratorial e manutenção em biotérios em condições altamente controladas (COX & BROWN, 2003). Além disso, é uma das poucas espécies de mamíferos, cuja manutenção de células tronco indiferenciadas em cultura é viável, possibilitando a retirada de genes por recombinação homóloga e geração de modelos já citados.



### 2.1.3 Metodologias disponíveis para o desenvolvimento de camundongos transgênicos

Mamíferos transgênicos têm sido produzidos com muito sucesso, entretanto a eficiência de sua produção é extremamente variável entre as espécies. Características inerentes ao tipo de DNA microinjetado, ou o procedimento técnico empregado em cada laboratório, assim como as características reprodutivas das espécies envolvidas, influenciam nessa inconstância de resultados entre as espécies (HIARABAYASHI et al., 2001).

Por conseguinte, a grande maioria das publicações envolvendo animais transgênicos utiliza como modelo animal os camundongos, havendo apenas poucas aplicações dessa biotecnologia em animais de fazenda. Isso se deve ao alto custo envolvido e, as dificuldades técnicas associadas com a sua aplicação nessas espécies (WALL, 1996).

Para se obter um animal transgênico é necessário primeiramente identificar e isolar o gene de interesse mediante processos metodológicos de clonagem gênica. Posteriormente, é imprescindível construir o transgene, selecionando elementos regulatórios, como os promotores (elemento regulatório que direciona a expressão do gene para determinado tecido) e “enhancer” (elemento regulatório que aumenta a expressão de um gene) (RICHARDSON et al., 1997). O passo seguinte para desenvolver um modelo transgênico é, a depender do tipo de modificação a ser efetuada (introdução, inativação ou modificação de um gene), a utilização, por exemplo, de vetores, elementos que ativem e reprimam a expressão de um transgene no organismo.

### 2.1.3.1 Adição gênica ou modelo de superexpressão de um gene

Por definição, entende-se por adição gênica a metodologia de gerar animais geneticamente modificados onde várias cópias de um gene (endógeno ou de outra espécie) são adicionadas em seu genoma. Também denominado de modelo de superexpressão de um gene, a consequência geralmente vista é o aumento da produção da proteína codificada pelo transgene.

Uma característica desse tipo de metodologia é que a inserção do transgene no genoma do animal se dá de forma aleatória. Isso implica em consequências que podem ser danosas ao organismo. Por exemplo, como o local de inserção onde o gene é integrado é incerto, o mesmo pode se inserir em uma região cromossômica que dificulte ou inviabilize sua expressão, bem como provocar a inativação de um gene essencial ao desenvolvimento embrionário, com consequente morte prematura do animal.

Por conseguinte, devido a esse efeito aleatório de inserção, o fenótipo que o animal transgênico venha a apresentar pode ser independente do transgene, isto é, não foi devido a uma característica do gene inserido, e sim ao local no qual esse gene se integrou (efeito não intencional da transgenia). Além disso, o número de cópias do transgene não pode ser controlado, bem como seu nível de expressão. Esta característica pode ser valiosa no estudo da função de genes, pois a integração aleatória gera mutações insercionais que podem gerar efeitos fenotípicos de grande interesse. Aliado a isso, é possível caracterizar molecularmente o gene mutado e determinar sua função no desenvolvimento, o que não é possível nas mutações espontâneas.

Há fatores que afetam a eficiência da frequência de integração e/ou estrutura da seqüência de DNA integrado ao genoma. Deve-se considerar a influencia do número de moléculas de DNA injetadas, a forma e o tamanho do DNA (a forma linear facilita a integração, em detrimento da circular), o tampão de injeção (ausência de partículas, pH = 7,4, por exemplo), métodos de purificação da amostra do DNA, o método de isolamento do vetor, quando utilizado (vetor procarioto pode inibir a expressão gênica), o sítio de injeção, além das condições do laboratório, qualidade sanitária e genética dos animais utilizados, habilidade técnica, equipamentos e condições da cultura dos embriões (RICHARD et al., 1997).

É comum que o *locus* de integração do transgene contenha múltiplas cópias do transgene e, geralmente, das centenas de cópias microinjetadas, algumas se tornam incorporadas no genoma em uma única localização no cromossomo. Se a integração ocorrer no estágio de uma célula, todas as células do feto e placenta devem conter o transgene. Entretanto, se a integração ocorrer posterior ao início das clivagens, os blastocistos serão mosaicos e o transgene poderá ser encontrado no feto ou somente na placenta, ou em ambos (BRINSTER et al., 1985).

Devido à sua simplicidade e eficiência, esse tipo de metodologia é amplamente difundido na área biotecnológica. Existem atualmente diversas técnicas para se produzir animais transgênicos por adição de segmentos de DNA ao genoma, as quais serão descritas a seguir.

### 2.1.3.1.1 Microinjeção pró-nuclear

Microinjeção pró-nuclear é a mais popular e reprodutiva metodologia para introduzir DNA em embriões visando à produção de animais de laboratório e domésticos transgênicos (BEHBOODI et al., 1993). Essa técnica foi o marco inicial na introdução de material genético em células da linhagem germinativa (GORDON, 1998), e freqüentemente causa a expressão dos genes doadores com elevada eficiência (BRINSTER et al., 1981). Entretanto, a sua aplicabilidade em animais de fazenda é limitada pela dificuldade de se obter um grande número de zigotos para microinjeção, pela baixa eficiência de integração no genoma embrionário e alto custo envolvido em manter um não-transgênico descendente a termo (BEHBOODI et al., 1993).

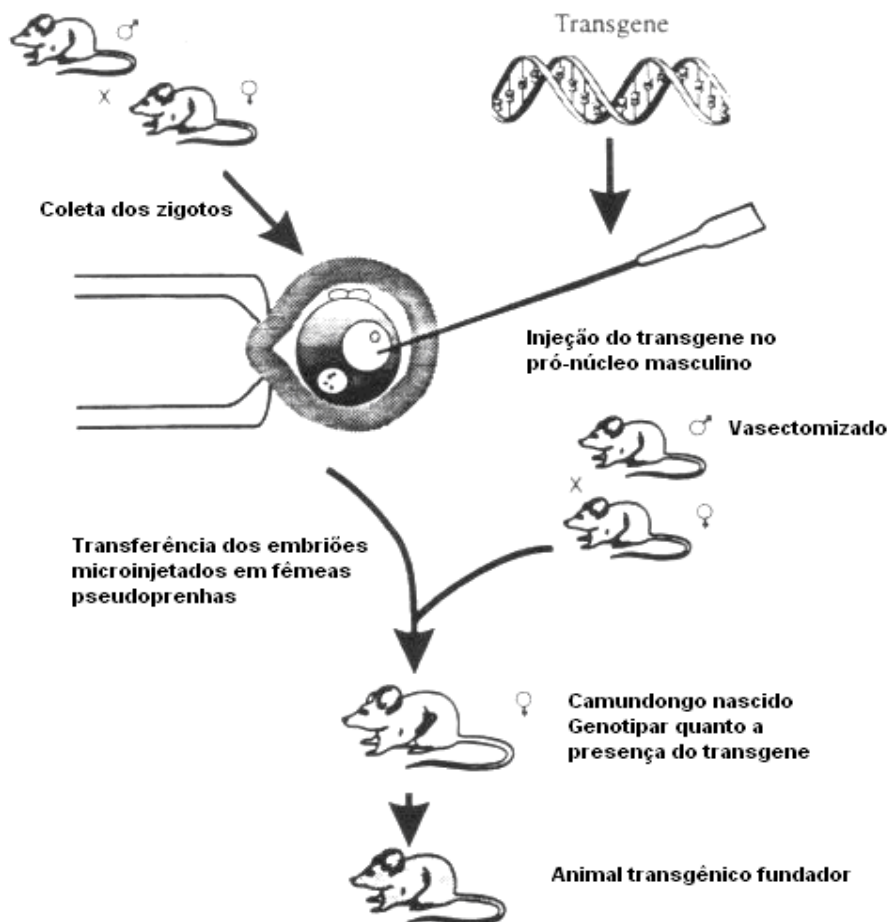
As principais limitações dessa técnica são a baixa sobrevivência dos embriões e a baixa eficiência de integração do transgene. Em animais domésticos, aproximadamente 1% ou menos dos zigotos injetados resultam em nascimento de descendente transgênico (CHAN, 1999). Em camundongos, a taxa de eficiência é algumas vezes superior, alcançando 20 a 30% de nascidos e, 3 a 5% dos zigotos microinjetados (WALL, 2001). Esse cenário pode ser resultado de alguns fatores que influenciam direta ou indiretamente a eficiência de produção dos animais, tais como a linhagem e a idade dos animais utilizados, o protocolo de superovulação e a qualidade dos zigotos coletados, o método usado para preparo do DNA, a hora da microinjeção pró-nuclear, a concentração do DNA microinjetado e a destreza e experiência na manipulação dos embriões (NOTTLE et al., 2001).

Por exemplo, em ratos, apesar da similaridade fisiológica e reprodutiva com os camundongos, os mesmos apresentam algumas peculiaridades quanto à aplicação dessa tecnologia. Primeiramente verifica-se uma elevada proporção de zigotos não fertilizados ou degenerados em resposta ao tratamento superovulatório, com elevada variação quanto ao número de zigotos isolados entre ratas, individualmente. Verifica-se também uma alta flexibilidade e viscosidade da membrana citoplasmática e pró-nuclear, o que resulta em uma grande percentagem de zigotos que degeneram imediatamente posterior a injeção (POPOVA et al., 2004).

Uma fêmea sexualmente madura apresenta em seu ovário oócitos primários interrompidos na prófase da primeira divisão meiótica. Sob influências hormonais da puberdade, o oócito primário completa sua primeira divisão meiótica, tornando-se ovócitos secundários, com a formação do primeiro corpo polar. Ocorrendo a ovulação, o núcleo do ovócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, que progride até a metáfase, quando esta é interrompida. Se, o mesmo for fertilizado por um espermatozóide, a segunda divisão meiótica é completada, com a formação do segundo corpo polar. Todos os corpos polares degeneram e o resultado é um zigoto maduro, contendo dois pró-núcleos, um masculino e outro feminino, que são os núcleos materno e paterno originários, respectivamente, do óvulo e do espermatozóide. Antes que essas estruturas embrionárias se unam para formar um único núcleo, que facilita a integração do novo DNA no genoma, a microinjeção do transgene é efetuada em um desses pró-núcleos (geralmente no masculino, devido ao seu maior tamanho) e espera-se, portanto, que haja a integração da nova seqüência introduzida.

Uma vez microinjetados, os embriões são transferidos para o oviduto de uma fêmea pseudoprenha previamente sincronizada para estar em condições fisio-reprodutivas de levar a termo os zigotos nela inovulados. Conforme dito, somente alguns animais nascidos possuirão o transgene integrado em seus cromossomos, de forma aleatória, de forma que todas as células do animal serão geneticamente modificadas, inclusive as germinativas. Uma vez detectada a presença do transgene no genoma dos animais nascidos, mediante a genotipagem dos mesmos, esse animal é dito fundador de uma linhagem transgênica, diferindo de outro fundador em função o local de integração e ao número de cópias do gene exógeno no genoma (PESQUERO et al, 2008).

A figura 1 mostra um desenho esquemático desse tipo de metodologia.



**Figura 1: Desenho esquemático da microinjeção pró-nuclear em embriões de camundongo.** Após ser submetida ao processo superovulatório, mediante aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG) em intervalos de 48 horas, as fêmeas são acasaladas na proporção de 1:1, com machos na mesma linhagem, a fim de se obter um grande número de zigotos. Na manhã seguinte, os zigotos são coletados, mediante eutanásia das fêmeas, que apresentam tampão vaginal (resultado da secreção seminal do macho em contato com a mucosa vaginal da fêmea). Esses zigotos são selecionados quanto à viabilidade embrionária e, algumas horas após o período de cultivo *in vitro*, os embriões são microinjetados no pró-núcleo com o transgene. Os embriões sobreviventes a esse procedimento são selecionados e transferidos para o oviduto de fêmeas pseudoprenhas, que foram submetidas ao mesmo procedimento superovulatório e mantidas com machos vasectomizados para estarem fisiologicamente preparadas para levar a termo tais embriões involuados. Após 21 dias de gestação e 21 dias de desmame, esses animais serão genotipados para confirmar a presença do transgene integrado no genoma, e fenotipados a fim de verificar se o referido gene exógeno está sendo expresso no animal.

Fonte: RICHARDSON e colaboradores, 1997

### 2.1.3.1.2 Vetores virais

Após o trabalho pioneiro de Jaenish e Mintiz, em 1974, com a produção de um camundongo saudável carreando cópias de DNA viral do SV40 e, a subsequente confirmação de que as células da linhagem germinativa expressavam material viral proveniente do vírus da leucemia Moloney (MLV) por Jaenish e colaboradores em 1976, sucedeu-se de forma exponencial o desenvolvimento de métodos de transgênese mediada por vetores virais, usando vírus recombinantes para carrear genes.

A transferência de genes mediada por vírus envolve diferentes tipos vetores, sendo que os mais utilizados compreendem os adenovírus, os retrovírus e, os lentivírus. Os adenovírus são vírus DNA pertencentes à família *Adenoviridae* e, infectam células em divisão celular ou não. Sua grande limitação é que eles não são capazes de integrar seu material genético no cromossomo da célula infectada e, sua expressão não dura por muito tempo.

Os retrovírus pertencem à família *Retroviridae*, família esta caracterizada por possuir como material genético o ácido ribonucléico (RNA). Como não possuem DNA, os vírus dessa família invadem as células por retrotranscrição, ou transcrição reversa (formação de uma molécula de DNA a partir de um RNA, pela enzima transcriptase reversa).

Existem dois tipos de vetores da família *Retroviridae* que têm sido utilizados para gerar animais transgênicos, os vetores derivados do genoma de protótipos retrovírus (por exemplo, o MLV) e os vetores derivados do material genético de lentivírus, caracterizados por possuírem um genoma mais complexo e por carrearem no mínimo três genes adicionais (DESROSIERS, 2001).



Anterior à descoberta dos lentivírus como vetores de genes na transgenia, os protótipos de retrovírus eram utilizados com muito sucesso na época. Entretanto, a transferência de gene mediada por retrovírus apresenta algumas limitações. Primeiramente, diz respeito à pequena quantidade de informação genética (<10 kb) que os mesmos podem transportar, uma vez que há uma limitação física quanto ao volume das partículas virais. Isto é observado na prática, pois longas seqüência regulatórias estão sendo utilizadas com freqüência por pesquisadores para melhorar a variável expressão dos transgenes (WALL, 2002). LTRs (“long terminal repeats”) virais têm sido utilizados como controle dos transgenes em vetores retrovirais para possibilitar a redução do comprimento das seqüência dos mesmos. Essa estratégia apresenta alguns inconvenientes observados por alguns autores, tais como a redução da transcrição do transgene, ser responsável pela hipermetilação dos mesmos e interferir, conseqüentemente, nos promotores dos mamíferos por suprimir ou direcionar de forma errada a expressão de um gene hospedeiro (ROBL et al, 2007).

Uma diferença substancial entre os protótipos retrovírus e os lentivírus, quando utilizados como vetores na transgênese, é que os lentivírus podem modificar uma larga escala de tipos celulares e integrar no genoma do hospedeiro em células em divisão ou em estágios pós mitóticos, resultando em uma expressão longa do transgene *in vivo* e *in vitro* (TISCORNIA et al., 2006), em contraste com os protótipos retrovirais, que são dependentes do ciclo celular da célula, com transferência gênica ocorrendo somente nas células hospedeiras quando as mesmas estão se replicando no momento da infecção (MILLER et al., 1990). Por exemplo, os neurônios são muito resistentes à

infecção e transdução viral por retrovírus, uma vez que estes requerem células que estejam em ativa divisão para infectar.

Por conseguinte, há riscos envolvidos com a utilização dos vetores lentivirais para transferir genes. Verifica-se que durante a integração do vírus no genoma da célula hospedeira, há um elevado risco de ocorrer mutações em genes endógenos e, uma baixa tendência de ativar oncogenes, com o consequente desenvolvimento de câncer.

Um parâmetro que requer muita atenção, é a prevenção de uma disseminação não controlada do vetor sendo, necessário, tomar algumas precauções durante o processo inicial de preparo, a fim de otimizar esse vetor para terapia gênica (HOUDEBINE, 2002).

Por oferecer versatilidade em infectar um largo espectro de células hospedeiras e integrar seu genoma em diferentes ciclos celulares (IKAWA et al, 2003), a transgênese por lentivírus se tornou um eficiente método para gerar animais modificados geneticamente. Um vetor lentivírus contém o vetor carreando o transgene de interesse e plasmídeos carreando proteínas virais requeridas no processo, além de elementos que aumentam a expressão dos transgenes (“enhancers”). Além disso, para reduzir o efeito dos LTRs virais, algumas seqüência deste (“enhancer” e seqüência promotoras) têm sido deletadas e substituídas por seqüência promotoras ubíquas, ou por promotores tecido-específicos (MIYOSHI et al, 1998).

Além de conter os genes gag, pol e env (que codificam proteínas estruturais), enzimas virais e um envelope glicoproteico, características estas comuns a família *Retroviridae*, os lentivírus, quando comparados com os retrovírus, possuem três genes adicionais, tão como tat e ver, que contribuem

consideravelmente para um ciclo de vida mais complexo dos mesmos (PFEIFER, 2004). Uma vez o vírus dentro da célula hospedeira ocorre a transcrição reversa do seu material genético de RNA para DNA e conseqüente integração no genoma hospedeiro. Isso é de extrema importância para possibilitar a transmissão da infecção do provirus integrado no genoma do hospedeiro aos seus descendentes (MILLER, 1990).

A zona pelúcida do zigoto constitui uma barreira física para a infecção lentiviral. No entanto, é possível removê-la, assim como injetar partículas virais dentro do espaço perivitelino, também denominada de injeção subzonal (SINGER, et al., 2006), conforme demonstrado na figura 2. A injeção subzonal é menos lesiva à membrana celular do embrião que a microinjeção pró-nuclear e, tomando em conta somente os animais nascidos, a transgênese lentiviral é 4 vezes mais eficiente (WALL, 1996). Além disso, vetores lentivirais podem ser utilizados para transferir genes em células-tronco embrionárias (HAMAGUCHI et al., 2000).



**Figura 2: Injeção subzonal de vetores lentivirais para geração de animais transgênicos.** As partículas virais são depositadas entre a zona pelúcida e a membrana citoplasmática dos zigotos.  
Fonte: PFEIFER, 2004

Baseados em um método modificado de injeção no espaço perivitelino, Ritchie e colaboradores, em 2007, demonstraram que através de repetidas injeções de preparações com baixo título de vetores lentivirais pode-se obter 23% dos embriões carreando o transgene, especialmente quando comparado com 1% dos mesmos, provenientes de uma única microinjeção.

Portanto, a utilização de vetores lentivirais constitui uma promissora ferramenta para produção de linhagens transgênicas em diferentes espécies animais.

#### 2.1.3.1.3 Interferência por RNA

A interferência por RNA (RNAi) é uma técnica recente e extremamente promissora que engloba uma série de processos nucleares e citoplasmáticos, possibilitando um específico silenciamento pós-transcricional de genes alvo (ZERBINI et al., 2005).

Esse fenômeno foi primeiramente observado em plantas no final da década de 1980. Entretanto, foi na década de 1990, em um trabalho com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, que foi demonstrado o mecanismo de silenciamento genético (FIRE et al., 1998).

Em linhas gerais, o RNAi utiliza uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA – double strand RNA) que, quando ativado na célula, se liga à seqüência complementar de nucleotídeos existente no RNA mensageiro, causando a sua destruição e suprimindo, desta forma, a transcrição gênica. É um mecanismo de regulação da própria célula, com promissores benefícios para a terapia gênica de doenças. A produção desses dsRNAs, um

intermediário do ciclo de replicação de vírus com genoma de RNA, induz o silenciamento direcionado contra seqüência do genoma viral.

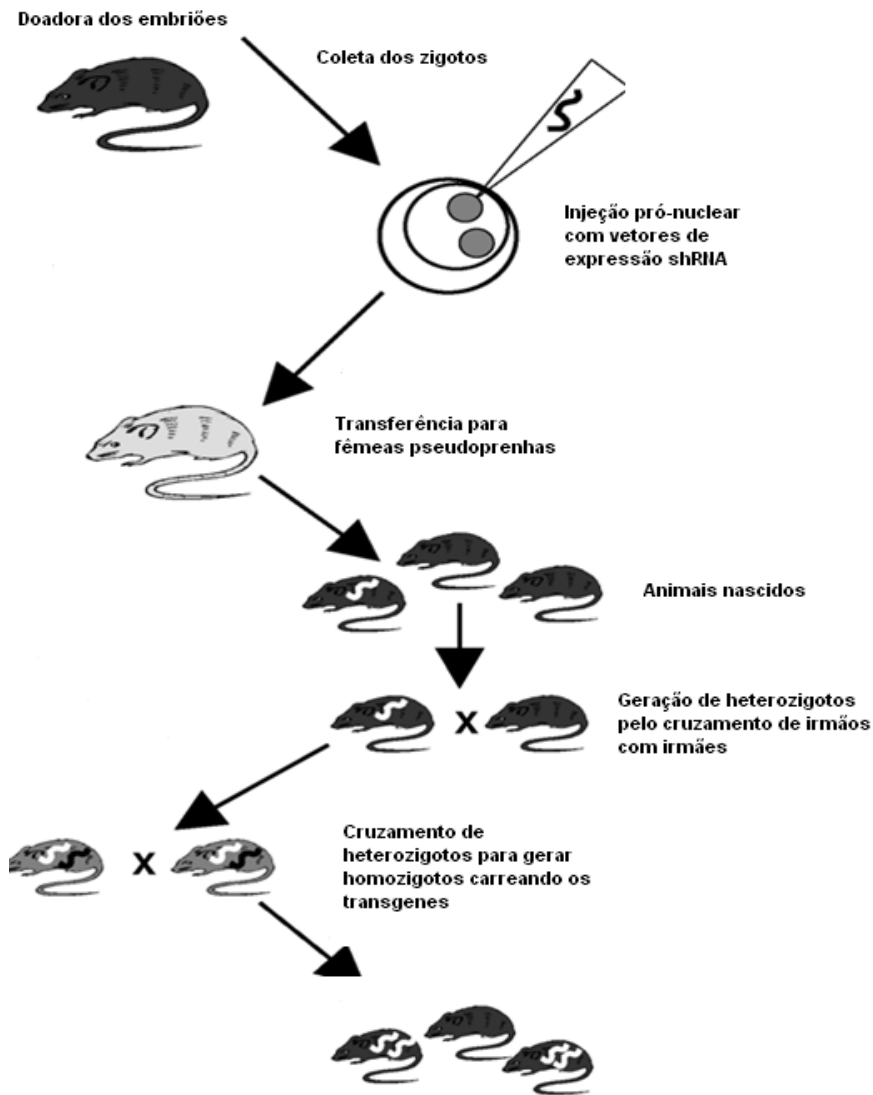
O mecanismo de silenciamento do RNA engloba o processamento de longas moléculas de dsRNAs (300-800 pb) em pequenas moléculas siRNA, (“small interfering RNAs”, com aproximadamente 21-23 nucleotídeos), por uma enzima específica, a RNAase III, denomina de Dicer (LEUNG & WHITTAKER, 2005), requerendo moléculas de ATP para esse processo. O siRNA fita dupla se associa então a proteína R2S2, que discrimina qual das duas fitas do siRNA será incorporada ao complexo RISC (“RNA induced silencing complex”). Este complexo direciona então a clivagem seqüência-específica de RNAm e o conseqüente silenciamento gênico (BANTOUNAS et al., 2004).

Sua utilização mais freqüente é na genética reversa: silenciar um gene (*knock down*), com a perda incompleta da função gênica e, com o propósito de observar o fenótipo resultante. Para direcionar a expressão intracelular dos siRNAs, vetores são construídos utilizando shRNAs (“hairpin structures”), eficientemente ligados ao RNAi. Além disso, um oligonucleotídeo contendo seqüência senso e anti-senso de DNA homólogas ao RNAm alvo podem ser clonados no vetor de expressão shRNA, para aumentar a eficiência de transmissão do desejado fenótipo *knockdown/out*, na linhagem germinativa. Estes são então microinjetados no pró-núcleo de zigotos e então transferidos para fêmeas pseudogestantes (Figura 3) resultando na geração de animais transgênicos (HICKMAN-DAVIS & DAVIS, 2006).

Tecnicamente simples, rápido e de custo relativamente baixo, especialmente quando confrontado com outras metodologias de silenciamento de genes, como a produção de animais *knock out*, o silenciamento por RNA é

conservado em plantas e animais e é evidenciado naturalmente no organismo como mecanismo de defesa contra vírus invasores ou transposons (TIJSTERMAN et al., 2002).

Nesse cenário, a RNAi se tornou uma importante ferramenta para a genômica funcional em células animais (KUHN et al., 2007) além de demonstrar aplicações valiosas na medicina terapêutica, especialmente no descobrimento de poderosas drogas alvo da indústria farmacêutica (LU et al., 2005).



**Figura 3: RNA interference:** Um vetor de expressão shRNA é injetado diretamente no pronúcleo de zigotos de camundongos.  
 Fonte: HICKMAN-DAVIS & DAVIS, 2006.

#### 2.1.3.1.4 Via transposons

Transposons são seqüência de DNA móveis que podem se autoreplicar no genoma de uma célula, em um processo denominado de transposição. Por conseqüência, podem ser responsáveis por mutações no material genético e, são exemplos de elementos genéticos móveis. Também chamados de “jumping genes”, esses elementos foram primeiramente descritos por Bárbara McClintock, o que lhe rendeu o prêmio Nobel em 1983 (MCCLINTOCK, 1983).

As seqüência dos transposons são transcritas em moléculas de RNA e estas retranscritas em DNA, a qual é integrada em múltiplos sítios do genoma sob ação da transposonase (HOUDEBINE, 2002b). Desta forma, os transposons podem ser utilizados para aumentar as taxas de integração do transgene no genoma hospedeiro, uma vez que, em muitas espécies, verifica-se uma baixa eficiência de integração.

Incluem nessa família os elementos Sleeping beauty (HACKETT et al., 2004), Tol2 (URASAKI et al., 2008) e piggyBac (TAMURA et al., 1999) como vetores não virais que aumentam a integração gênica.

Uma limitação dos transposons é o limitado espaço para carrear genes externos (HOUDEBINE, 2002a). Para obter mais espaço e, prevenir que o transposon recombinante se dissemine de forma descontrolada, o gene da transposonase é deletado e, uma transposonase exógena é complementada no vetor a fim de integrar o vetor recombinante no genoma hospedeiro, uma vez que sozinho ele é incapaz de fazê-lo. Geralmente, um plasmídeo circular contendo uma construção capaz de expressar o gene da transposonase é



injetado juntamente com o vetor recombinante (HOUDEBINE, 2002b), viabilizando, desta forma, a integração do mesmo no genoma hospedeiro.

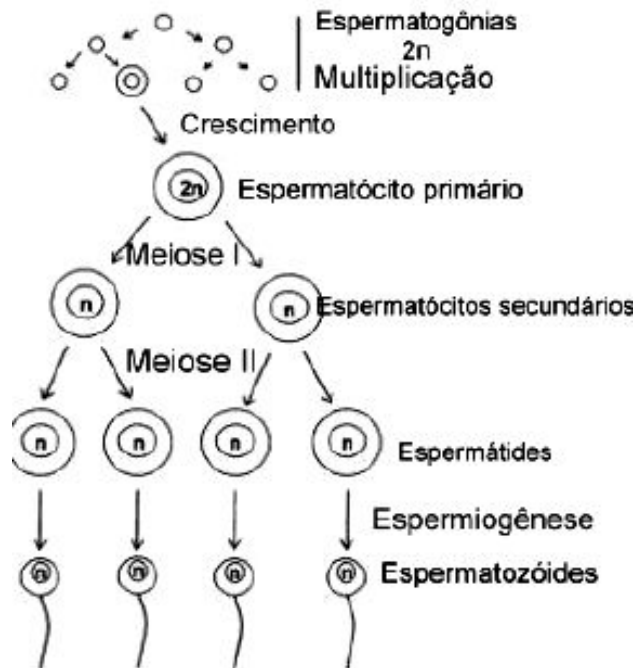
#### 2.1.3.1.5 Transferência de gene mediada por espermatozóide

Em linhas gerais, a maioria das técnicas de produção de animais transgênicos baseia-se no uso de zigotos ou oócitos derivados das fêmeas e, conseqüentemente estão sujeitas a similares limitações das metodologias que envolvem o uso e manipulação de zigotos. Em muitos casos, a eficiência da transgenia envolvendo camundongos não excede 5-10%, chegando a 1% em outras espécies. Por conseguinte, a depender da espécie, é muito comum a coleta de poucos zigotos e a maioria destes são frágeis e degenerados e, portanto não superam a manipulação a que são submetidos (KANATSU-SHINOHARA & SHINOHARA, 2007).

Para contornar esse contexto, recentes dados indicam que animais transgênicos podem ser gerados através da transferência do transgene nas chamadas “spermatogonial stem cells” (SSCs), células estas que entram em um complexo processo de diferenciação e divisões e geram os espermatozoides, população única de células pós-natais que podem autorenovar-se e transmitir as características genéticas para próxima geração (BRISNTER & ZIMMERMANN, 1994).

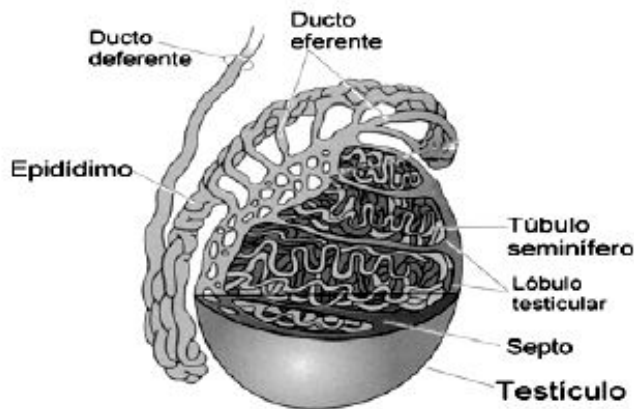
Na fase embrionária as células germinativas diplóides do testículo multiplicam-se ativamente por mitose gerando as espermatogônias ou células germinativas masculinas, que continuam em um processo contínuo de replicação, gerando mais espermatogônias (auto-replicação) e também células

que resultarão futuramente em um espermatozóide. No nascimento esse processo é interrompido, retornando, a atividade quando a puberdade é iniciada. Na puberdade, as espermatogônias começam a aumentar em número no interior dos túbulos seminíferos dos testículos e, após sucessivas divisões mitóticas, geram os chamados espermatócitos primários. Estes sofrem a primeira divisão meiótica, resultando em espermatócitos secundários, haplóides e, subseqüente segunda divisão meiótica, gerando as espermatídes. Estas, em um processo denominado espermiogênese, transformam-se em espermatozóides maduros que caem na luz do túbulo seminífero, sendo transportados para o epidídimo, onde serão armazenados por tempo indeterminado (BRINSTER & AVARBOCK, 1994). Uma vez capacitados, ganham mobilidade e, sob estímulos, são eliminados pelas vias genitais, durante a ejaculação (Figuras 4 e 5).



**Figura 4: Espermatogênese.**

Fonte: <http://www.fiel.edu.br/painel/uploads/gametogenese>



**Figura 5: Anatomia do testículo e epidídimo**

Fonte: [http://www.mfn.unipmn.it/~pons/index\\_file/imm%20app%20urogenitale/epididimo.jpg](http://www.mfn.unipmn.it/~pons/index_file/imm%20app%20urogenitale/epididimo.jpg)

Recentemente têm-se desenvolvido métodos para isolar, manipular geneticamente e transplantar as SSCs de ratos e camundongos (McLEAN, 2005) assim como identificar marcadores específicos dessas células, tais como

Stra8 (CHOI et al., 2004) e E-cadherin, o que possibilita a seleção dessas células. Como essas células são capazes de colonizar testículos receptores e formar espermatozóides capazes de fertilizar oócitos (OGAWA, 2001), a modificação genética das SSCs, por exemplo, através de transfecção in vitro com vetores de expressão, retro- e lentivírus e siRNAs, provê uma poderosa ferramenta para a geração de animais transgênicos.

A combinação da transferência de genes mediada por espermatozóides (SMGT) com outras metodologias tem sido efetuada de forma eficiente por cientistas em todo mundo. Sin e colaboradores em 2000 conseguiram gerar galinhas e bovinos transgênicos mediante a combinação da SMGT com a integração mediada por enzimas de restrição, aumentando a integração do transgene com o espermatozóide. Com o mesmo propósito, Gagne e colaboradores, em 1991, utilizaram a eletroporação do DNA no espermatozóide de bovinos antes de realizar a SGMGT, obtendo sucesso nesse procedimento. Anticorpos também têm sido utilizados para o mesmo propósito de facilitar a associação do transgene com o espermatozóide (QIAN et al., 2001). Por conseguinte, a combinação da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) para transferir genes em oócitos tornou-se uma importante estratégia para gerar animais transgênicos (HOCHI & HIRABAYASHI, 2002).

Portanto, além da simplicidade e da mínima manipulação embrionária requerida, a transferência de genes mediada por espermatozóides constitui um excelente método de escolha para manipulação genética, especialmente em espécies em que a manipulação de oócitos ou zigotos apresenta dificuldades particulares (WALL, 2002).

### 2.1.3.1.6 Transferência de segmentos cromossômicos

A transferência de segmentos cromossômicos, como YACs (“yeast artificial chromosomes”), P1 derivado de cromossomos artificiais ou os BACs (“bacterial artificial chromosomes”), constitui uma poderosa metodologia de escolha para transferir genes em animais, devido ao tamanho de seus insertos (variando de aproximadamente 100 para mais de 1000 kilobases [Kb], dependendo do seu tipo), assegurando o padrão de expressão do transgene em função dos vastos elementos regulatórios que podem ser inseridos neles (MOREIRA et al., 2004).

Richa e Lo, em 1989, microinjetaram diretamente no pronúcleo de zigotos de camundongos fragmentos de cromossomos humanos dissecados e, os mesmo exibiram pré e pós-desenvolvimento embrionário normais, além de apresentar o material humano em uma análise do fragmento da cauda desses animais. Entretanto, verifica-se uma baixa eficiência do método em virtude das extensivas sessões de microinjeções e do elevado número de oócitos requeridos (MOREIRA et al., 2007b).

Desta forma, além da microinjeção pronuclear, os fragmentos cromossômicos podem ser introduzidos na linhagem germinativa dos animais transgênicos por lipofecção do DNA YAC, por exemplo, em células-tronco embrionárias (ES) ou pela fusão das denominadas “yeast cells” (“spheroplasts”) com células ES (GIRALDO & MONTOLIU, 2001). Porém, esses métodos demandam muito tempo para gerar um animal quimérico, e a integração dos fragmentos deve ter uma atenção especial quanto a sua efetividade (MOREIRA et al., 2004)

Um método alternativo tem sido desenvolvido e efetuado para gerar camundongos transgênicos por YAC. A microinjeção intracitoplasmática de espermatozóide em oócitos na metáfase II (Figura 6), carreando extensos fragmentos cromossômicos, apresenta elevada eficiência (10-20%, a depender da concentração das amostras YAC DNA utilizadas) em comparação com a microinjeção pronuclear (5%) (MOREIRA et al., 2007a).



**Figura 6: Injeção intracitoplasmática de espermatozóide de camundongo em um oócito na metáfase II.**  
Fonte: MOREIRA et al., 2007b.

### 2.1.3.1.7 Transferência nuclear de células geneticamente modificadas

A técnica de transferência nuclear baseia-se na fusão do núcleo de uma célula doadora com o citoplasma de uma célula enucleada e subsequente ativação do conjunto. Uma vez havido o desenvolvimento embrionário, cada embrião será geneticamente idêntico à célula que doou o núcleo (CAMPBELL et al., 1998).

Como as células-tronco embrionárias têm a capacidade de gerar todos os tecidos de um organismo, inclusive os gametas, a incorporação do transgene nessas células e a incorporação destas, após uma seleção de quais apresentam o transgene inserido, em oócitos enucleados e até mesmo em embriões em estágios de pré-implantação, permitem a aplicação dessa metodologia para gerar organismos geneticamente modificados e, por conseguinte transmitir essa modificação aos seus descendentes.

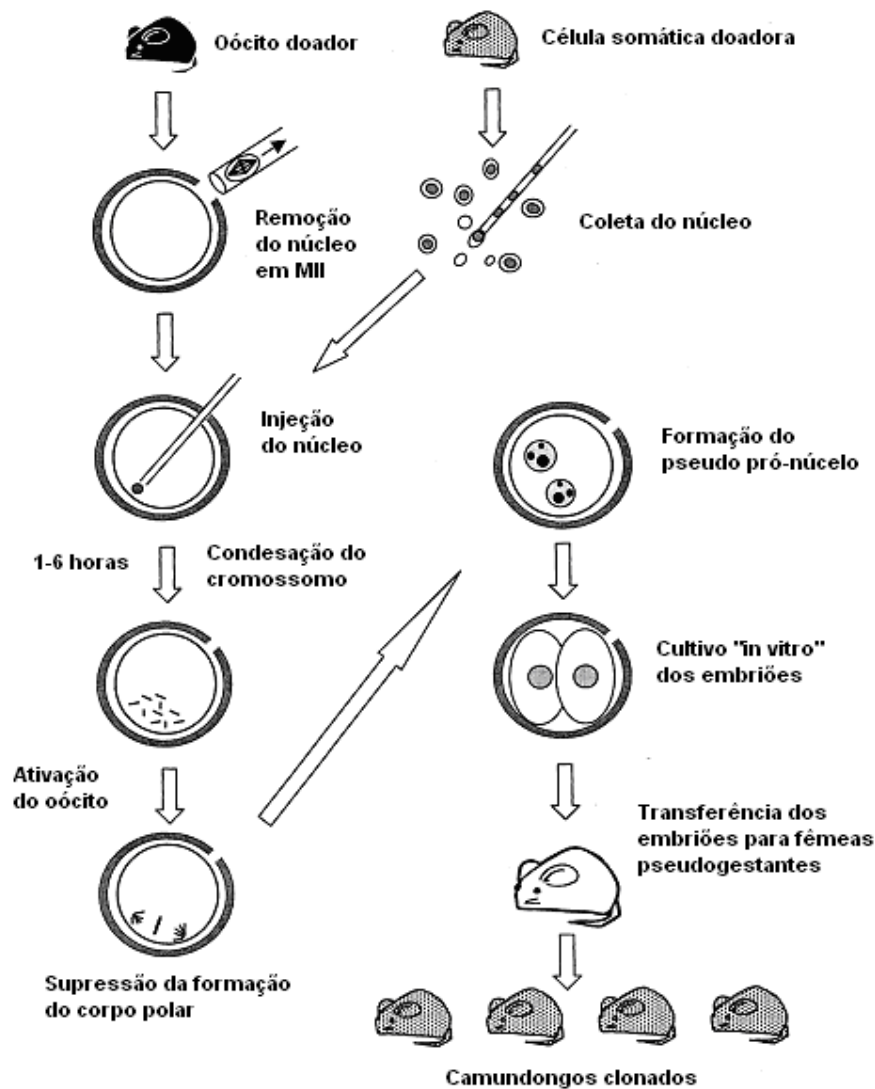
O fato de as células-tronco embrionárias estarem bem caracterizadas em camundongos as torna uma excelente ferramenta para estudos da função gênica. Entretanto, sua aplicabilidade é baixa para outras espécies, como os animais de produção, em virtude da ausência da completa caracterização dessas células nessas espécies. Uma alternativa é a utilização de células somáticas geneticamente modificadas, permitindo desta forma, o estudo da integração dos transgenes em animais e um amplo estoque de material genético para futuras manipulações.

A modificação das células pode ser efetuada por diferentes metodologias, sendo as mais utilizadas a transfecção do transgene por lipossomas, transdução por vetores virais e por eletroporação.

Alguns cuidados devem ser tomados ao manipular essas células. Observa-se uma menor efetividade do material para clonagem por transferência nuclear quando as mesmas são cultivadas por um longo período de tempo. Mutações de genes essenciais para o desenvolvimento embrionário podem ocorrer no animal em vida ou em células cultivadas (HOUDEBINE, 2002b). Além disso, um estudo desenvolvido por Kang e colaboradores, em 2001, demonstrou que o genoma dos embriões de bovinos gerados pela técnica de transferência nuclear de células somáticas era aberrantemente metilado.

Segue a seguir um diagrama ilustrando uma metodologia de clonagem em camundongos (Figura 7).





**Figura 7: Diagrama da clonagem de células somáticas em camundongos.** Oócitos doadores são coletados e seu núcleo na metáfase II é removido cirurgicamente. Células do cúmulo de outra linhagem de camundongo são coletadas, lavadas, suas membranas plasmáticas rompidas e seus núcleos injetados individualmente nos oócitos enucleados. Após 1-6 horas em cultivo, os oócitos são ativados pelo uso de  $Sr^{2+}$ . Os oócitos ativados contêm dois ou mais pseudopronúcleos e são então transferidos para fêmeas pseudoprenhas. Fonte: WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1999.

### 2.1.3.2 Modificação genética dirigida

A modificação genética dirigida ou recombinação homóloga em células-tronco embrionárias (ES cells) é uma metodologia amplamente utilizada para modificar o genoma dos animais, em especial os camundongos, em algum *locus* escolhido, cuja integração entre o vetor contendo o transgene e DNA genômico não ocorre de forma randômica, e sim dirigida (MULLER, 1999).

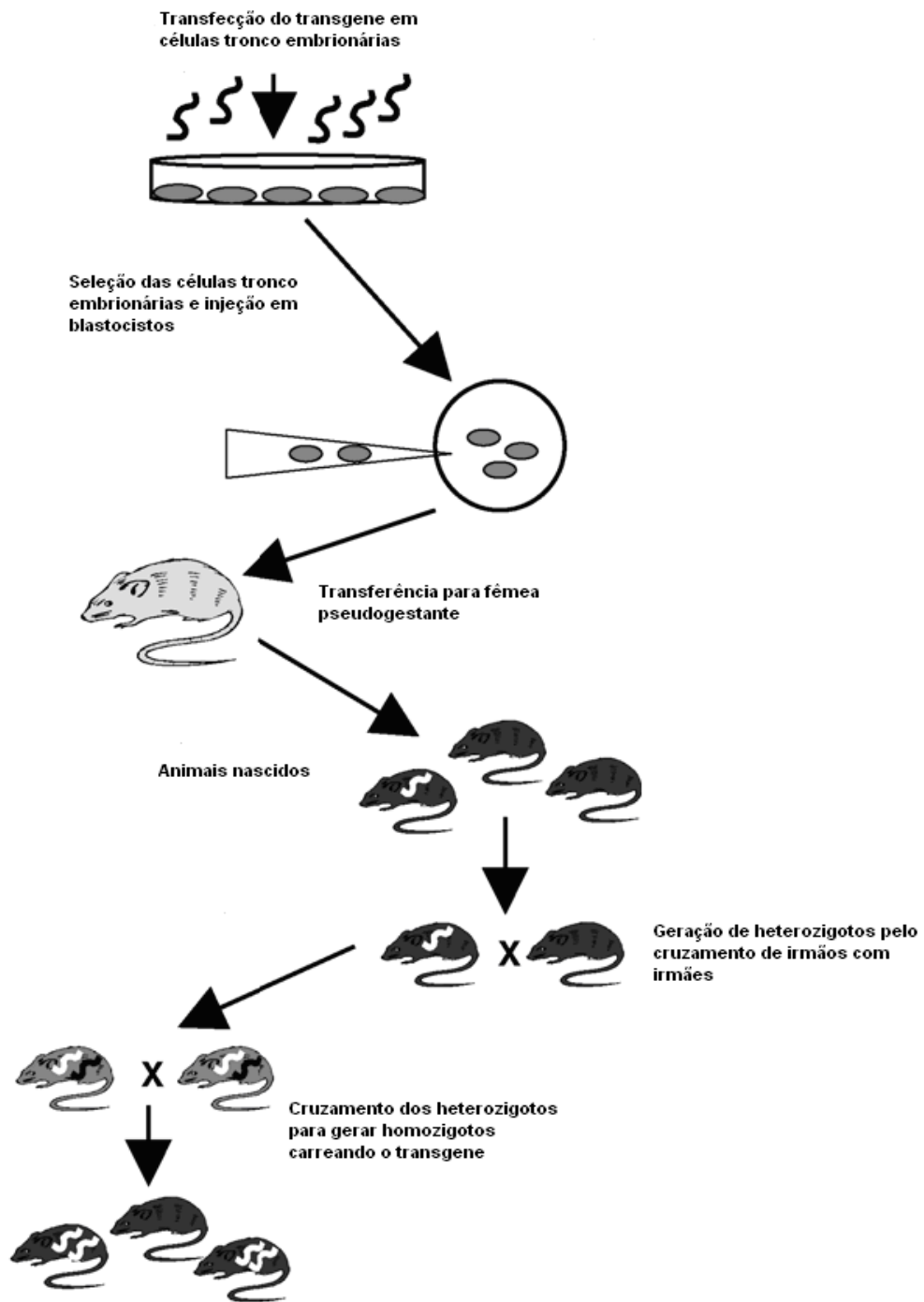
Essa técnica possibilita substituir um gene funcional por uma seqüência mutada que, uma vez introduzida, inativa o gene endógeno original, gerando animais conhecidos como *knockout* ou, altera uma pequena seqüência do gene, gerando o modelo *knockin*, cuja modificação foi dirigida e controlada.

Essa metodologia envolve a modificação das células-tronco embrionárias *in vitro*, por um processo conhecido como recombinação homóloga (troca de sequencias de DNA correspondentes entre cromossomos, que ocorre no núcleo celular naturalmente), dando origem a um animal com um gene inativado ou alterado (EVANS, 1998). Uma ilustração do processo de geração de animais transgênicos através da técnica de mutação sítio-dirigida está demonstrado na figura 8.

As células-tronco embrionárias pluripotentes são provenientes da massa celular interna de um blastocisto. Elas são capazes de se diferenciar em todas as células do corpo e, quando injetadas em blastocistos não cessam essa diferenciação e contribuem para o desenvolvimento de um organismo quimérico, possuindo, desta forma, duas linhagens de células diferentes: uma originária das células pluripotentes modificadas e a outra do blastocisto receptor no qual as células foram introduzidas (MANSOURI, 1998).

Por conseguinte, e de extrema importância, têm-se desenvolvido metodologias que utilizam a recombinação homóloga e células-tronco embrionárias para gerar a chamada mutagênese condicional, isto é, gerar animais transgênicos controlados, condicionados a indução intencional da interrupção (ou expressão) de algum gene em algum tipo celular e/ou em algum tempo do desenvolvimento (BABINET, 2000). Os dois sistemas mais utilizados em camundongos transgênicos são o sistema induzido por tetraciclina e o sistema *Cre/loxP* recombinase. Ambos os sistemas requerem *in vivo* a geração de dois grupos de camundongos transgênicos (HICKMAN-DAVIS & DAVIS, 2006).

A recombinação homóloga é amplamente utilizada para gerar modelos de camundongos transgênicos, espécie esta em que se verifica o completo domínio sobre o cultivo das células-tronco embrionárias. Entretanto, essa metodologia para outras espécies, exceto a humana, apresenta limitações quanto a sua aplicabilidade, uma vez que evidencia-se dificuldade para manter essas células em estado indiferenciado quando cultivadas *in vitro*.



**Figura 8: Recombinação homóloga.** Células-tronco embrionárias recombinadas são injetadas nos blastocistos e transferidas para fêmeas pseudogestantes.  
 Fonte: HICKMAN-DAVIS & DAVIS, 2006

## 2.2 PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE

A proteína fluorescente verde (GFP) é proveniente da água viva *Aequorea victoria* e tem gerado imenso interesse na pesquisa porque ela oferece meios para marcar e visualizar células e proteínas de forma não invasiva, podendo ser utilizada tanto em células vivas quanto em uma variedade de organismos, incluindo bactérias, nematódeos, fungos, *Dictyostelium*, *Xenopus*, *Drosophila*, plantas, camundongos e linhagens de células de mamíferos (CUBITT et al., 1995).

Além dos comprimentos de ondas de absorção e emissão do cromóforo serem em regiões visíveis e a fluorescência ser intrínseca à molécula, cuja reação catalítica não requer nenhum cofator, o cDNA para GFP pode ser clonado e expresso em algum tipo celular e usado como um “alvo” fluorescente (KARLSSON & PINES, 1998).

A criação de animais transgênicos expressando um transgene marcador de células que pode ser detectado facilmente é essencial no que diz respeito a distinguir populações de células *in vivo*, demonstrando uma excelente utilidade desta biotecnologia para marcar células doadoras em estudos de transplante de células, como na terapia celular (KISSEBERTH et al., 1999).

Desta forma, o transplante de células provenientes dos animais transgênicos para a GFP permitem estudar o processo de migração para o tecido lesado, assim como a diferenciação dessas células em tecidos com capacidade funcional normal, fornecendo ferramentas de análise para a terapia celular regenerativa especialmente de doenças crônicas degenerativas.

## 2.3 APLICAÇÕES DA TRANSGENIA ANIMAL

A habilidade de modificar o genoma de um animal oferece uma oportunidade única para estudar a função de um gene em uma variedade de circunstâncias fisiológicas e patológicas (HICKMAN-DAVIS & DAVIS, 2006). Uma vez que os processos interativos dos mamíferos vivos são muito complexos, sua reprodução *in vitro* se torna, conseqüentemente, improvável. Assim, a possibilidade de modificar o patrimônio genético de um animal possibilita a avaliação dessas alterações tanto na anatomia quanto na fisiologia de um organismo vivo.

Na ciência de animais de laboratório, o desenvolvimento de modelos para estudos acarretou na substituição crescente dos modelos convencionais por esses modelos modificados, assim como uma redução no número de animais utilizados na experimentação animal, devido ao maior poder de resposta aos objetivos dos estudos que os animais geneticamente modificados proporcionam.

O desenvolvimento de raças de animais transgênicos portando genes adicionais para superexpressar características de produção animal, como ganho de peso rápido, produção de leite elevada, resistência a carrapatos e doenças que implicam diretamente na redução da produção, alta adaptabilidade ao meio, são exemplificações do potencial dessa biotecnologia no setor agropecuário.

Em pesquisa básica, a transgenia animal permite a avaliação da estrutura, regulação e função gênica pela observação direta dos efeitos causados pela superexpressão, modificação ou inativação no fenótipo de um

animal geneticamente modificado, bem como o estudo dos mecanismos de diferenciação e ativação de genes específicos pelo uso de promotores que direcionam a expressão do gene. Adicionalmente, a geração de modelos transgênicos apresentando doenças similares aos humanos (GODARD & GUÉNET, 1999) possibilita entender a fisiopatologia de uma determinada doença, além de propiciar o delineamento de formas mais eficazes de tratamento, descobertas de novos testes diagnósticos e agentes terapêuticos mais baratos, específicos e desejados, como a terapia gênica.

Além disso, é possível utilizar os animais transgênicos, especialmente os de grande porte, como biorreatores, produzindo proteínas recombinantes humanas de interesse médico como enzimas, hormônios e fatores de crescimento (YANG et al., 2008) em grande escala para indústria farmacêutica. A doação de tecidos e órgãos de animais geneticamente modificados contendo proteínas de superfície celular humanas para serem transplantados em humanos - xenotransplante - possibilita uma fonte alternativa para driblar a rejeição imunológica observada nessa prática e ampliar as possibilidades de transplantes a serem efetuadas na população necessitada (PLATT & LIN, 1998).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Esse estudo visa utilizar a técnica transferência de genes mediada por vírus para a produção de linhagens de camundongos transgênicos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Gerar camundongos transgênicos através da injeção de vetores lentivírus contendo gene codificante para a GFP, sob o controle dos promotores humanos ubiquitina-C, alfa miosina cardíaca e FmTie, no espaço perivitelino de zigotos;
- Genotipar e fenotipar os animais gerados para a identificação da presença e do padrão de expressão do transgene.



#### **4 JUSTIFICATIVA**

Uma vez que em estudos que envolvem transplante de células, como a terapia celular, é difícil distinguir subpopulações de células pelos critérios morfológicos mais comumente utilizados, a produção de uma linhagem transgênica expressando uma proteína que funcione como marcadora de células irá, conseqüentemente, fornecer subsídios para diferenciar uma regeneração tecidual proveniente do transplante celular de algum mecanismo regenerativo inerente ao animal, confirmando então a potencialidade das células tronco transplantadas na regeneração de órgãos e tecidos lesados.

Sob esse contexto, o desenvolvimento de linhagens de camundongos transgênicos expressando a proteína verde fluorescente em diferentes órgãos e tecidos tem por finalidade gerar novas ferramentas para o estudo dos mecanismos de migração e diferenciação das células-tronco da medula óssea em modelos de doenças crônico-degenerativas.

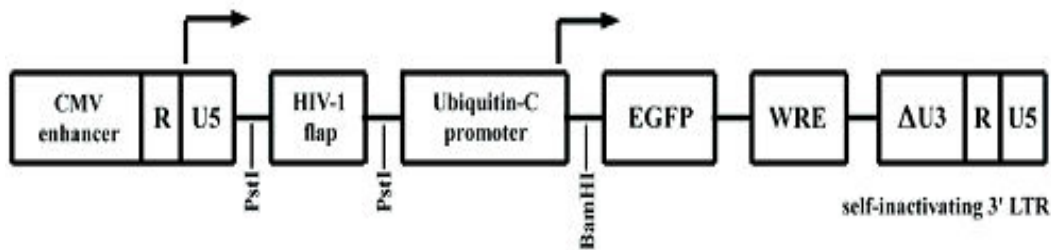
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 VETOR LENTIVÍRUS

Para produzir os animais transgênicos, utilizamos vetores lentivírus contendo o gene codificante para a GFP sob controle do promotor humano da ubiquitina-C, que controla a expressão da proteína nos embriões e em todos os tecidos do camundongo adulto, da alfa miosina cardíaca, que direciona a expressão nos cardiomiócitos e, da FmTie, que controla a expressão gênica apenas em células endoteliais de vasos.

Desta forma, todos os vetores foram desenvolvidos para carrear um promotor interno que dirigisse o gene repórter GFP. Para aumentar o nível de transcrição, um elemento regulatório pós-transcricional do vírus da hepatite (WRE) foi inserido “downstream” ao GFP. Para aumentar o título viral, um elemento “flap” do vírus-1 da imunodeficiência humana (HIV-1) foi inserido entre o segmento 5’ do LTR (“long terminal repeat”) e o promotor para direcionar a expressão da proteína, em um determinado tecido ou célula. Para maximizar a expressão do genoma viral (RNA) durante a transfecção, todos os vetores possuem o “enhancer” CVM substituído na região U3 da região 5’ LTR, já mencionada.  $\Delta$ U3 denota uma deleção na região U3 do segmento 3’ do LTR que faz a região 5’ LTR do próvirus integrado ser transcricionalmente inativo. As posições PST I e Bam HI indicam os sítios de restrição.

Esse vetor lentiviral foi denominado de FUGW e, sua estrutura é demonstrada na figura 9.



**Figura 9: Diagrama do vetor lentiviral FUGW usado para gerar camundongo transgênico sob controle do promotor da ubiquitina-C.** Somente porções relevantes do plasmídeo são mostradas.

Fonte: LOIS et al., 2002.

O volume de vetores lentivirais microinjetados no espaço subzonal é bastante difícil de ser controlado, porém, estima-se que foram introduzidos 10 a 100 picolitros/injeção no espaço perivitelino de um único zigoto de camundongo. Os vírus eram concentrados por ultracentrifugação para aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades infecciosas (U.I.)/ $\mu$ l (microlitros), totalizando uma média de 10 a 100 partículas virais microinjetadas por embrião micromanipulado.

As construções foram geradas em colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular no Instituto do Coração (Incor), sendo armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ao serem utilizadas, as mesmas eram descongeladas em banho de gelo e submetidas à centrifugação a fim de decantar os *debris* celulares que obstruem a pipeta de microinjeção quando aspirados pela mesma, inviabilizando todo o processo.

## 5.2 ANIMAIS UTILIZADOS

A princípio foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6 fêmeas com 4-5 semanas, como doadoras dos embriões a serem submetidos a microinjeção no espaço perivitelino, em número superior a cento e vinte animais. Esses embriões eram posteriormente transferidos para o oviduto de fêmeas da linhagem BALB/c, com 2-3 meses. Machos da mesma linhagem, com cerca de oito semanas de idade, eram utilizados para fertilizar os embriões das fêmeas doadoras dos embriões e, outros, submetidos ao processo cirúrgico de remoção de uma porção do canal deferente a fim de induzir o estado de pseudoprenhez nas fêmeas que iriam receber os embriões.

Para fertilizar os oócitos, foram utilizados machos F1 C57Bl/6 X BALB/c, a partir da oitava semana de vida e, como indutores da pseudoprenhez das fêmeas receptoras dos embriões, machos da linhagem  $Kit^{lac/z}$  e F1 C57Bl/6 X BALB/c vasectomizados, também com idade superior a oito semanas. A interrupção do fluxo do espermatozóide, pela retirada de uma porção do canal deferente – ou vasectomia – constitui uma estratégia para preparar o organismo da fêmea que irá receber os embriões.

Os animais foram mantidos no Biotério, setor banco de embriões e transgenia, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, à temperatura média de 21°C, com um fotoperíodo de 12 horas de luz, recebendo água e ração *ad libidum*.

As linhagens de camundongo utilizadas para o desenvolvimento de animais transgênicos para a GFP encontram-se sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1: Linhagens de camundongos utilizados no estudo.**

Linhagem	Especificação	Número de animais
C57Bl/6	Doadora dos embriões	120
BALB/c	Receptora dos embriões	40
F1 C57Bl/6 x BALB/c	Doadora dos embriões	26
F1 C57Bl/6 x BALB/c	Receptoras dos embriões	21

### 5.3 SUPEROVULAÇÃO

As fêmeas tiveram seus ovários estimulados com dois hormônios injetados via intraperitoneal, em intervalos de 46 a 48 horas, com um volume de 0,1ml/fêmea superovulada: a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) - Novormon® - seguida da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) - Vetecor®. Esses hormônios foram diluídos previamente em solução fisiológica, de forma a se obter a concentração final de 5 UI (unidades internacionais) por 0,1 ml da solução.

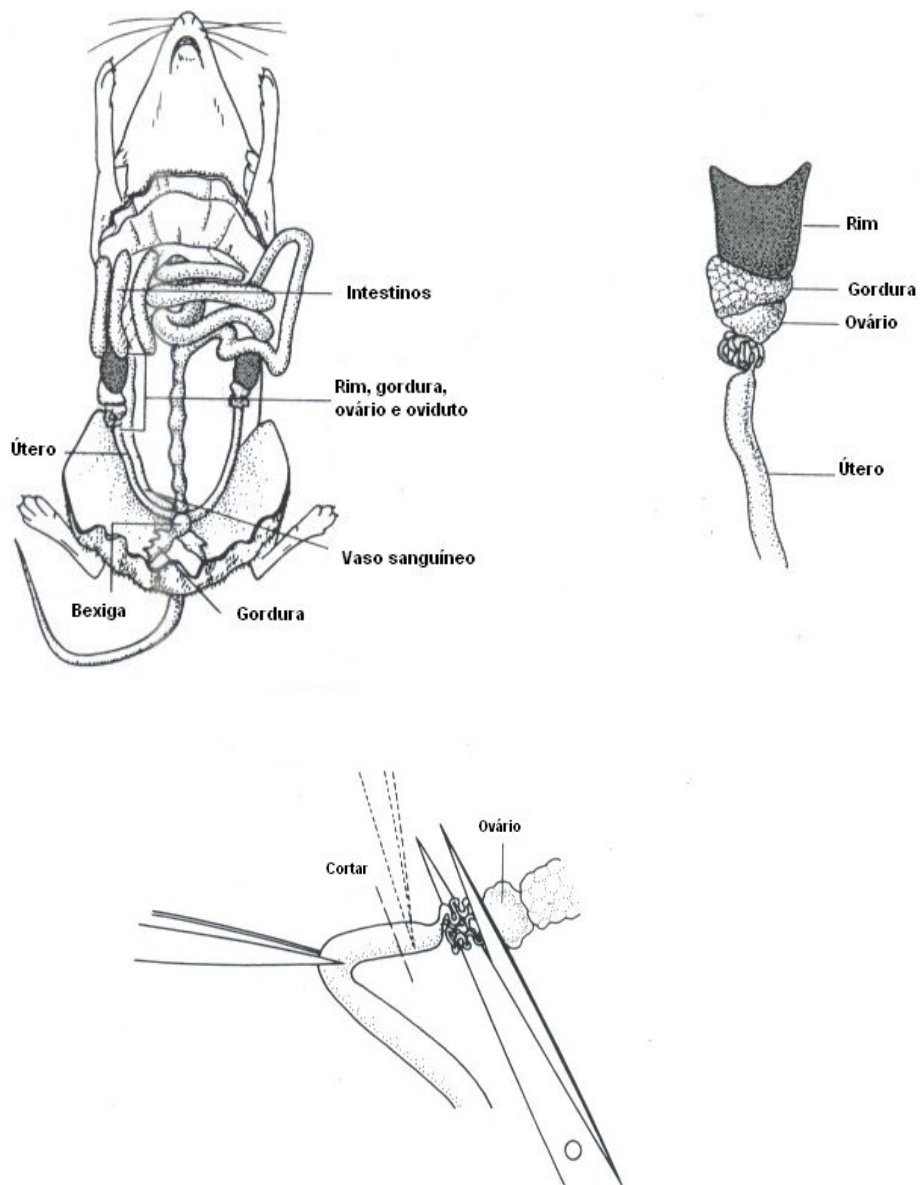
Imediatamente subsequente a aplicação do hCG, as fêmeas foram acasaladas na proporção 1:1 com machos durante uma noite, a fim de ocorrer a fertilização desses óocitos liberados ou induzir a pseudoprenhez nas fêmeas doadoras ou receptoras de embriões, respectivamente.

No dia seguinte, foi efetuada a verificação da presença do tampão vaginal na vagina da fêmea, decorrente da copulação. Somente as fêmeas que apresentaram o tampão vaginal foram utilizadas para geração dos animais transgênicos e para a inovulação dos embriões microinjetados. As doadoras sem a presença do tampão vaginal eram coletadas a fim de verificar a resposta

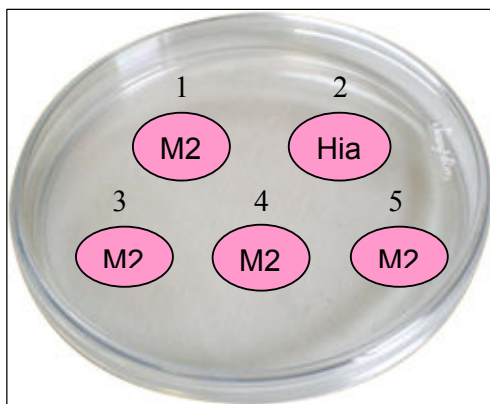
ao tratamento superovulatório e, as fêmeas receptoras sem tampão, eram reutilizadas 15 dias após a última aplicação do hCG como doadoras de embriões.

#### 5.4 COLETA DOS ZIGOTOS

Os zigotos foram coletados das fêmeas com tampão vaginal positivo aproximadamente 15 horas após a aplicação do hCG. Imediatamente posterior à eutanásia das fêmeas por deslocamento cervical, efetuou-se a retirada da tuba uterina (Figura 10) e transferência da mesma para uma placa de Petri de 60 mm contendo quatro microgotas com aproximadamente 40 µl do meio de manipulação de embriões (M2) e, uma microgota com a mesma quantidade de uma solução contendo meio M2 e uma solução de hialuronidade (300mg/ml) para a dissolução das células do *Cumulus oophorus*. A disposição das mesmas são ilustradas na figura 11.



**Figura 10: Coleta do oviduto.** Uma vez rebatida cranialmente as alças intestinais, os rins e os cornos uterinos são expostos. O oviduto fica justamente abaixo do ovário e este encoberto por uma densa gordura que também envolve caudalmente o rim correspondente. Uma vez indentificados, um corte entre a ovário e o corno uterino é efetuado para a coleta da tuba uterina.

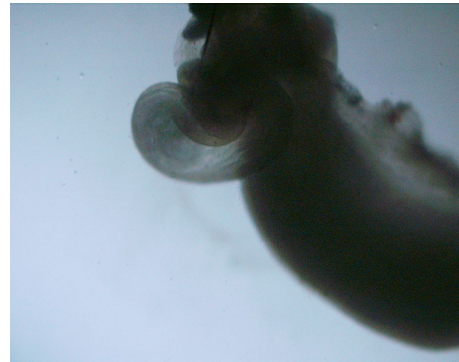
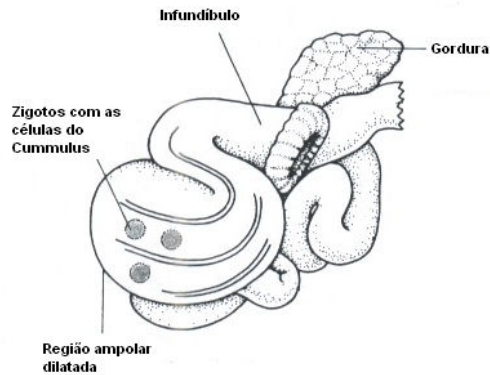


**Figura 11: Disposição das microgotas para coleta dos zigotos.** A numeração indica a quantidade e a ordem das gotas feitas na placa de Petri. Hia: solução contendo a enzima hialuronidase e meio M2.

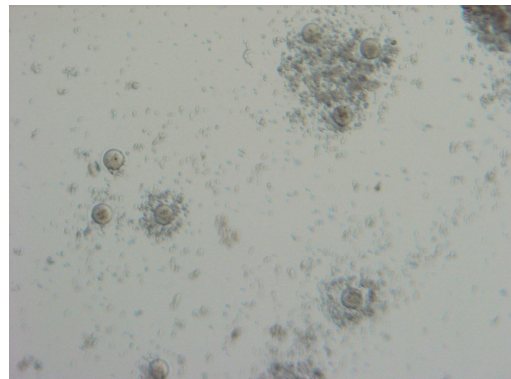
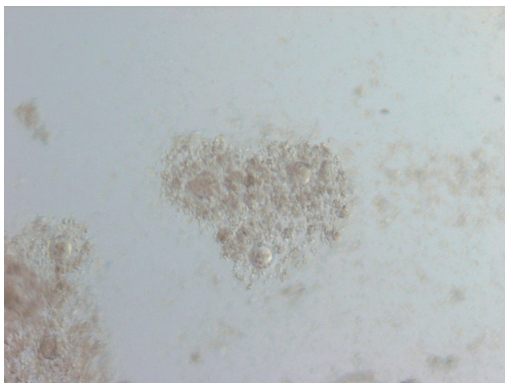
Sob um estereomicroscópio em aumento de 20X, os ovidutos coletados contendo os zigotos foram postos na microgota 1. Com o auxílio de uma agulha de 28G acoplada a uma seringa de 1 ml e, de uma pinça, a ampola uterina foi rasgada (Figura 12) e, os zigotos espontaneamente expostos pela pressão interna do oviduto que encontra-se preenchido de líquido. Estes foram então coletados e postos na microgota 2, permanecendo nesta por no máximo 30 segundos (Figura 13). Posteriormente, os zigotos passaram sucessivamente pelas gotas 3, 4 e 5, onde foram selecionados quanto a viabilidade.

Os embriões considerados viáveis foram cultivados *in vitro* em meio KSOM, encoberto com óleo mineral em estufa a 37° C contendo uma mistura gasosa composta de 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico, com circulação contínua e 95% de umidade relativa do ar, por aproximadamente 4 ou 5 horas.





**Figura 12: Desenho esquemático e fotografia de uma ampola da tuba uterina contendo os zigotos envolvidos nas células do Cumulus oophorus.** Verificar que a região encontra-se dilatada, sendo possível visualizar sob um estereomicroscópio os zigotos e suas respectivas células do *Cumulus*.



**Figura 13: Desnudamento dos zigotos.** Os embriões envolvidos nas células do Cumulus oophorus são postos numa solução contendo a enzima hialuronidase + M2, por aproximadamente 30 segundos, até a subsequente dissolução dessas células.

## 5.5 SELEÇÃO E CULTIVO DOS EMBRIÕES

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, os embriões são classificados de acordo com o seu grau de qualidade, a saber:

- Grau I ou excelente: Desenvolvimento correspondente ao dia da colheita, não existindo defeitos visíveis;

- Grau II ou bom: Embrião com muito poucos blastômeros desprendidos da massa celular, e uma pequena quantidade de *debris* celulares. Sua forma pode ser ligeiramente irregular;

- Grau III ou Regular: Embrião com vários defeitos, com *debris* celulares, forma irregular, cor muito escura ou muito clara, entre outros;

- Grau IV ou Ruim: Embrião com muitos defeitos, sendo correspondente ao grau III com desenvolvimento mais retardado, com ruptura da zona pelúcida, forma muito assimétrica, tendência a desintegração com granulação e desintegração dos blastômeros.

De acordo com esses parâmetros, os zigotos coletados foram então classificados e, somente os enquadrados como excelentes ou bons foram submetidos microinjeção subzonal e subsequentemente transferidos para fêmeas pseudoprenhas (Figura 14).

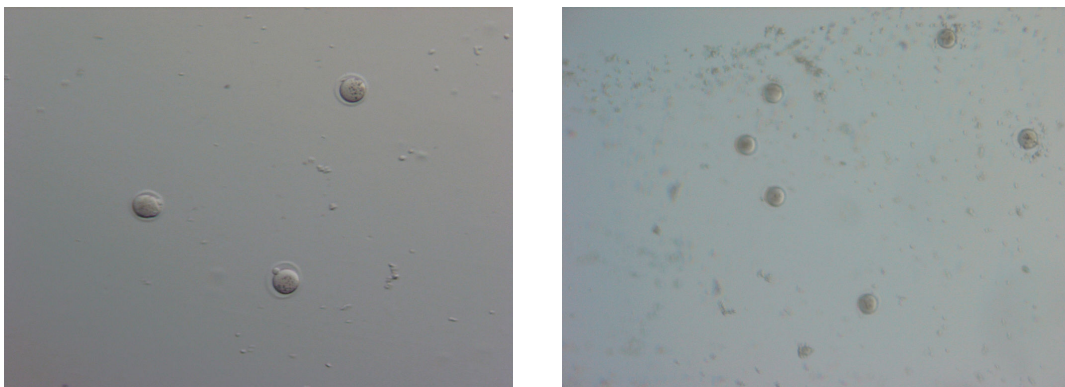


Figura 14: Embriões viáveis

## 5.6 MICROINJEÇÃO NO ESPAÇO PERIVITELINO

A microinjeção foi efetuada sob um microscópio invertido de alta resolução, acoplado a dois micromanipuladores laterais. Sob uma lâmina de vidro escavada, foi efetuada uma microgota de meio M2, coberta por óleo mineral onde os zigotos considerados viáveis após o período de cultura foram postos em número nunca superior a 20.

Os zigotos foram mantidos fixos com o auxílio do micromanipulador esquerdo por uma pipeta de contenção – “holding” – sob aspiração fraca, contínua e controlada. Com auxílio do micromanipulador do lado direito, uma microagulha – “microinjection” – contendo a solução lentiviral foi introduzida no espaço subzonal ou perivitelino dos zigotos que continham os pró-núcleos masculino e feminino e, cerca de duas microinjeções foram efetuadas, promovendo um movimento no citoplasma do zigoto, referente ao fluxo da solução nele injetado. A solução contendo o vetor lentivírus foi aspirada por ação da capilaridade para o interior da pipeta de microinjeção, uma vez que, a mesma continha em seu interior um fino filamento de vidro, que possibilita esse efeito.

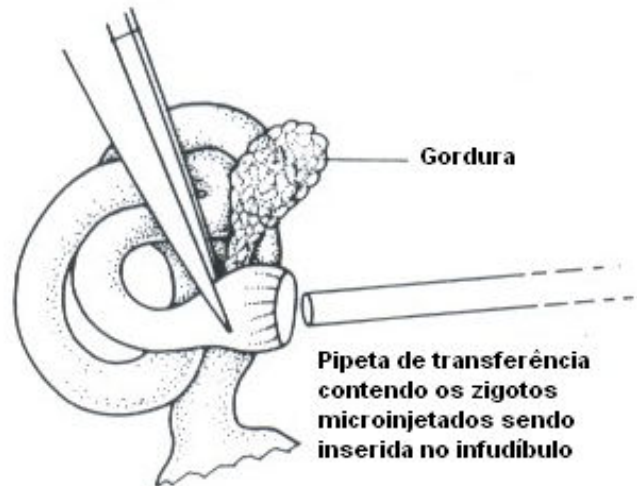
Subseqüente à microinjeção, os zigotos foram recolocados na estufa a 37° até o momento da reimplantação (aproximadamente 2 horas após a microinjeção).

## 5.7 TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES

Após esse período de cultura, os embriões microinjetados foram analisados quanto à sua viabilidade em relação à sobrevivência ao processo de microinjeção. Os considerados viáveis foram então transferidos para o oviduto de fêmeas que previamente foram acasaladas com machos vasectomizados na proporção 1:1 a fim de promover o sincronismo endógeno. As pipetas de transferência foram confeccionadas para possuir uma extremidade esticada pelo fogo de aproximadamente 1,5 cm. O interior das mesmas continham uma coluna óleo mineral, outra de ar, seguida de uma coluna de meio M2, outra de ar e, finalmente, M2 contendo os embriões em número médio de 15. Essas colunas são essenciais, uma vez que, funcionam como indicadores de que os embriões foram depositados no infundíbulo – primeira porção do oviduto – além de evitar um possível refluxo dos embriões para cavidade corporal.

Após a indução anestésica, foi efetuada a tricotomia de toda região abdominal lateral esquerda do animal e limpeza com uma solução a 70% de álcool. No ponto médio entre a última costela e o púbis, foi feito um corte na pele de aproximadamente 1 cm. O tecido subcutâneo, mucosa, muscular e serosa da cavidade peritoneal foram rebatidos e o ovário exteriorizado cuidadosamente pelo pinçamento da gordura adjacente ao mesmo. Sob um esteriomicroscópio, o ligamento mesovário foi rompido e papéis de filtro cortados e estéreis foram colocados abaixo do ovário e entre a junção tuba uterina-útero. A bolsa ovariana era então rompida com o auxílio de duas finas pinças e, o infundíbulo localizado. Assim, a pipeta contendo os zigotos era

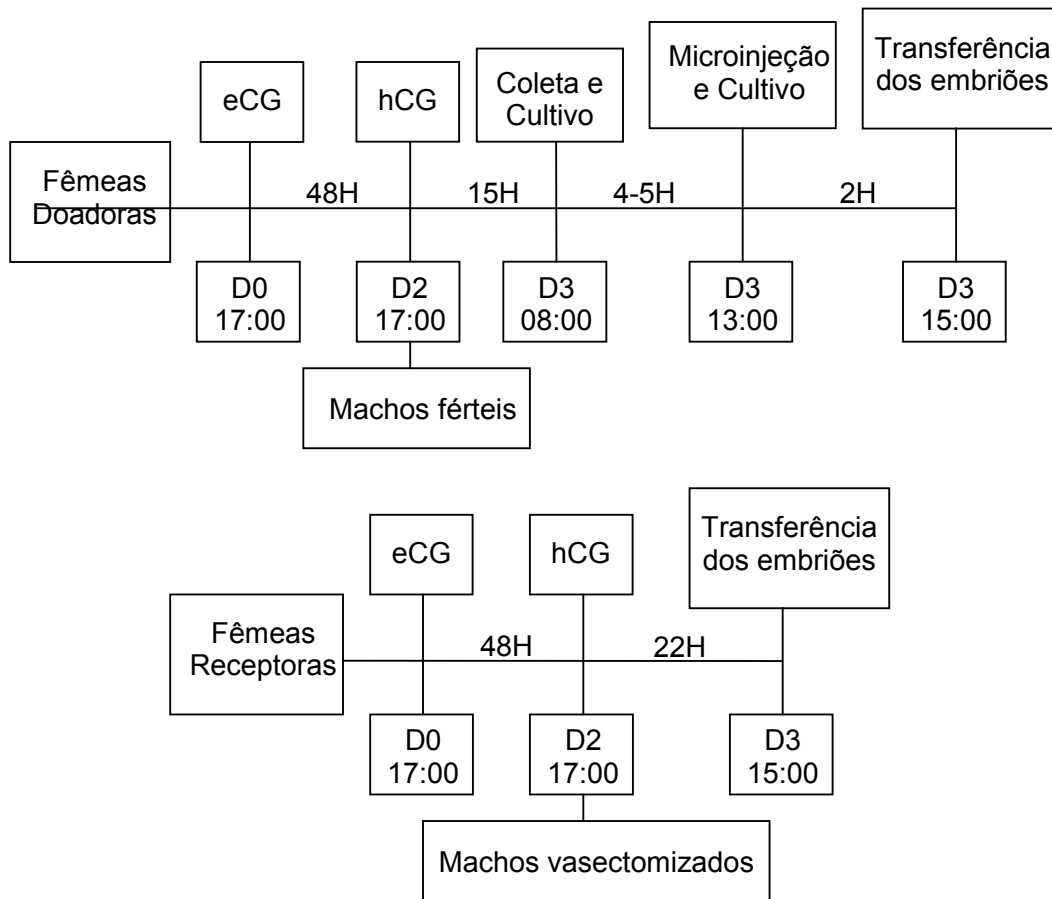
inserida nessa região (Figura 15) e os mesmos eram depositados lentamente no interior da tuba.



**Figura 15: Transferência dos embriões.** A pipeta de transferência contendo os zigotos submetidos a microinjeção subzonal de vetores lentivirais, é inserida no infundíbulo da tuba uterina com conseqüente inovulação dos mesmos em fêmea pseudoprenha.

Feito isso, os órgãos eram cuidadosamente acomodados na cavidade e efetuada a sutura em conjunto da serosa, muscular e mucosa. A pele era então suturada e, esperava-se a fêmea retornar da anestesia. Todo esse procedimento foi efetuado sob uma placa aquecida a 37°C, a fim de contornar a hipotermia causada pelos anestésicos. Por aproximadamente 21 dias, as fêmeas ficavam em observação, até a verificação da prenhez e acompanhamento de todo processo gestacional da mesma.

Segue abaixo, na figura 16, um diagrama que resume todo processo, desde a superovulação até a inovulação dos animais.



**Figura 16: Diagrama esquemático do processo de produção dos animais transgênicos efetuado nesse estudo.**

## 5.8 GENOTIPAGEM

O material utilizado para extração do DNA foi um fragmento de 1 cm da ponta da cauda dos animais após 21 dias de nascimento. Uma vez cortadas individualmente e sob condições estéreis, para evitar qualquer contaminação ambiente e entre as amostras, as mesmas foram submetidas à extração do material genético – DNA – pelo método fenol clorofórmio.

Assim, após serem picotas em placas de Petri de 30 mm, as caudas foram postas em microtubos devidamente identificados, sob uma solução de

tampão de lise (Tris 50 mM + NaCl 100 mM + EDTA 5 mM + SDS 1,5%) e, proteinase K (20 mg/ml). Após 4 horas no banho-maria a 37°C e sob agitação constante de 600 rpm, era acrescentado às amostras fenol e, as mesmas permaneciam nesse reagente por aproximadamente 5 minutos em banho-maria, sob agitação. Findo esse período, as amostras eram centrifugadas, o sobrenadante coletado e adicionados em microtubos contendo clorofórmio. Após 10 minutos em banho-maria, sob agitação e posterior centrifugação, o sobrenadante era translocado para microtubos limpos e nestes adicionados propanol 2 ou álcool isopropílico. Após uma rápida agitação dos microtubos em vórtex, o DNA estava precipitado, sendo visível a olho nú. O conteúdo líquido era vagarosamente desprezado, tendo o cuidado para não desprezar junto o DNA precipitado.

Assim, era adicionado aos microtubos álcool a 70% e, os mesmos eram centrifugados por 5 minutos a 800 rpm. Uma vez desprezado o álcool a 70% dos tubos, esperava-se evaporação do resquício do álcool nos tubos e, era adicionada aos mesmos 500 µl de água ultra-pura. As amostras permaneciam no banho-maria a seco sem agitação por 10 a 20 minutos a 95°C, a fim de dissolver o DNA precipitado no solvente aquoso. As amostras eram devidamente identificadas e então armazenadas a -20°C.

A quantificação das amostras foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro e, a partir desses resultados, a diluição da solução contendo o DNA para uma concentração final entre 5-20 ng/µl. Para a amplificação das amostras pelo método do PCR (polymerase chain reaction), utilizou-se os seguintes reagentes, a saber, tampão 10X, MgCl<sub>2</sub>, DNTPs (adenina, guanina, citocina e timina), primers forward (5'- CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G -

3') e reverse (5'- CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G -3') para GFP, Taq polimerase e água de PCR, para um volume final de 50 µl. Uma vez preparado o mix do PCR, eram adicionados as amostras (2 µl) e, as mesmas postas para amplificação na máquina de PCR. Foi adicionado ainda na amplificação amostras contendo o DNA de controles positivos e negativos - C57Bl/6 selvagem e C57Bl/6 eGFP, respectivamente – e, da solução denominada de branco, solução esta que contém todos os reagentes do mix do PCR à exceção das amostras contendo o DNA (para verificar se houve contaminação durante o processo).

O produto da amplificação foi então submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (tampão TBE + agarose), produzindo bandas visíveis à luz ultravioleta ou filmes de raios X, devido ao acréscimo de 1µl de brometo de etídio. Para eletroforese, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb e, o produto amplificado tem 405 pb. O primeiro animal nascido contendo o transgene foi denominado de Fundador

## 5.9 FENOTIPAGEM

Os camundongos que apresentaram bandas positivas na eletroforese foram submetidos à fenotipagem para verificar se o transgene inserido em seu genoma estava sendo ativamente expresso. Nesse estudo utilizamos três promotores diferentes, um que dirige a expressão da GFP no coração (alfa-miosina cardíaca), nos vasos endoteliais (FmTie) e, em todas as células e tecidos do organismo (ubiquitina-C).



Para análise da expressão do transgene pelo promotor da ubiquitina-C, foi efetuado um pequeno corte na ponta da cauda dos animais positivos a integração do transgene e, efetuado um esfregaço sanguíneo numa lâmina e, uma vez coberta com uma lamínula, foi examinada em um microscópio sob incidência direta de luz ultravioleta, com, conseqüente fluorescência das células que expressarem a proteína.

De maneira homóloga, os animais provenientes das construções cuja expressão da proteína se dá no coração e nos vasos endoteliais, são acasalados com camundongos C57Bl/6 selvagens e os filhotes que possuíam bandas visíveis na eletroforese, foram sacrificados para, com o auxílio de uma estereomicroscópio que emite luz ultra violeta, fosse feita a observação da fluorescência nesses órgãos.

#### 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A resposta das fêmeas à superovulação, assim como, o número, a média e o desvio padrão das estruturas coletadas em função do total de fêmeas superovuladas e que responderam ao tratamento, foram obtidos com o programa SPSS versão 3. Os dados foram testados pelo teste do Qui-quadrado, a um nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa Epi Info versão 6.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. COLETA E MICROINJEÇÃO DE EMBRIÕES

Os primeiros ensaios foram desenvolvidos com embriões provenientes da linhagem isogênica C57Bl/6, micromanipulados e inovulados para fêmeas isogênicas BALB/c. Como resultado, a maioria das estruturas embrionárias submetidas aos danos da microinjeção degeneraram (Figura 17).



**Figura 17: Zigotos da linhagem C57Bl/6 duas horas após a microinjeção no espaço subzonal com vetores lentivirais.** Pode ser observada a degeneração do citoplasma embrionário, evidenciado pela irregularidade das bordas da membrana, aumento de volume e granulações citoplasmáticas.

Mudamos a estratégia utilizando as linhagens híbridas como doadoras e receptoras dos embriões resultantes do cruzamento entre fêmeas C57Bl/6 e machos BALB/c, denominadas F1 C57Bl/6 X BALB/c.

Comparadas com as linhagens isogênicas, muitas linhagens híbridas apresentam uma relativa superioridade reprodutiva. Os resultados desse estudo relacionados à resposta das fêmeas ao tratamento superovulatório

estão sumarizadas na tabela 2. Das 146 fêmeas superovuladas, 68,5% responderam ao tratamento superovulatório, havendo uma tendência a superioridade híbrida sobre as isogênicas, ainda que não estatisticamente significativa ( $p=0,14$ ;  $X^2=2,21$ ).

Nós observamos que fêmeas da linhagem, C57Bl/6 tinham médias de  $7,18 \pm 6,4$  e  $10,9 \pm 4,6$  de estruturas coletadas em função do total de fêmeas superovuladas e que responderam, respectivamente; contra  $13,62 \pm 8,96$  e  $16,86 \pm 6,56$  das fêmeas híbridas (Tabela 3). Não observamos uma diferença significativa entre as respostas em função das linhagens ( $p=0,07$ ), entretanto, podemos afirmar em função do tamanho da amostra e da elevada variabilidade da resposta entre os indivíduos, que há uma tendência a haver diferenças relevantes entre os grupos testados.

**Tabela 2: Resposta das fêmeas ao tratamento superovulatório**

Linhagem	Número de animais que responderam
C57Bl/6	65,8% (79/120)
F1 C57Bl/6 x BALB/c	80,8% (21/26)
Média total	68,5% (100/146)

**Tabela 3: Número de estruturas coletadas de fêmeas superovuladas em função da linhagem utilizada**

Linhagem	Estruturas coletadas em função do total de fêmeas superovuladas (média±SD)	Estruturas coletadas em função do número de fêmeas que responderam (média±SD)
C57Bl/6	$7,18 \pm 6,40$ (n = 120)	$10,90 \pm 4,6$ (n = 79)
F1 C57Bl/6 x BALB/c	$13,62 \pm 8,96$ (n = 26)	$16,86 \pm 6,56$ (n = 21)
Total	$10,4 \pm 7,54$ (n = 146)	$13,88 \pm 5,23$ (n = 100)

O número de zigotos viáveis após a microinjeção subzonal em função das linhagens utilizadas, está demonstrado na tabela 4 ( $p>0,05$ ).

**Tabela 4: Número de estruturas viáveis após a microinjeção subzonal**

Linhagem	Estruturas viáveis	
	Coletadas	Pós-microinjeção
C57Bl/6	1185	464
F1 C57Bl/6 x BALB/c	438	397
Total	1623	861

Todos os embriões considerados viáveis foram implantados em número médio de 15 a 20 estruturas por fêmeas previamente sincronizadas. Obtivemos 09 gestações para os embriões híbridos e nenhuma gestação para os embriões C57Bl/6.

Os zigotos após a microinjeção com os vetores lentivírais no espaço subzonal também foram cultivados *in vitro* a fim de verificar a expressão da proteína fluorescente verde sobre os estágios subseqüentes de desenvolvimento embrionário. Entretanto, devido a um fenômeno conhecido com bloqueio celular, todos os zigotos não desenvolveram para o estágio de 2 células.

Conforme verificado nesse estudo, alguns procedimentos inerentes à coleta, microinjeção e inovulação dos zigotos devem ser efetuados segundo alguns critérios práticos. Primeiramente, respeitar os horários de aplicação dos hormônios. Uma vez que há uma elevada variabilidade quanto a resposta ao

tratamento superovulatório, baixos resultados foram verificados quando era desrespeitado o horário de aplicação dos hormônios.

O controle reprodutivo dos machos, respeitando o intervalo de 5 dias entre as cópulas e, a substituição dos mesmos após a verificação de 3 tampões vaginais consecutivos negativos e, também após 1 ano de utilização, deve ser também efetuado, pois o mesmo influencia diretamente sobre os resultados.

Os embriões devem permanecer no máximo 30 segundos na solução de meio M2 e hialuronidase, pois ultrapassando esse limite de tempo, a taxa de degeneração dos zigotos era superior. Da mesma forma que, as placas de cultivo *in vitro* dos zigotos devem ser colocadas na estufa 2 horas anterior ao seu uso.

Melhores taxas de sobrevivência embrionária ao cultivo *in vitro* são alcançadas quando durante a transferência para as gotas contendo o meio KSOM, os embriões passam por duas gotas sucessivas de meio KSOM, a fim de retirar todo resquício de meio M2 existente.

O procedimento cirúrgico para inovular os zigotos requer muita atenção e habilidade. Uma vez que o sangramento é extremamente prejudicial pois entope a pipeta de transferência e dificulta a visualização do infundíbulo, durante a abertura da cavidade abdominal e, o rompimento da bolsa ovariana deve-se evitar o rompimento de vasos sanguíneos que irrigam a região. Assim, evita-se perdas desnecessárias que inviabilizam todo o procedimento e resultados alcançados. Gestações foram alcançadas quando esses cuidados foram efetuados.

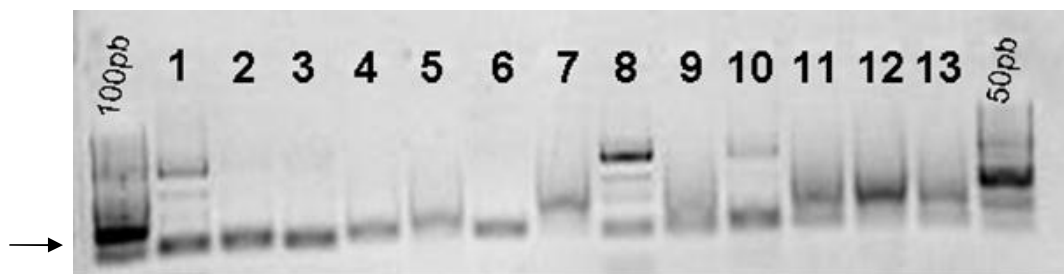
## 6.2.GENOTIPAGEM E FENOTIPAGEM DOS FILHOTES

A tabela 5 sumariza o número de animais nascidos em função dos diferentes promotores utilizados para direcionar a expressão do gene GFP.

**Tabela 5: Número de animais nascidos após a microinjeção sub-zonal sob o controle de diferentes promotores.**

Promotores	Número de animais nascidos
Ubiquitina-C	18
Alfa miosina cardíaca	7
Fmtie	6
<b>Total</b>	<b>31</b>

Subseqüente aos vinte e um dias de desmame, amostras de cauda dos animais foram utilizadas para extração de DNA e genotipagem por PCR. Foram obtidas na corrida eletroforética dos produtos de amplificação bandas visíveis a luz ultra-violeta em algumas amostras, conforme demonstrado na figura 18.



**Figura 18: Revelação do gel de agarose a 2%, resultante da amplificação do DNA por PCR convencional, de 09 animais para verificar a integração do GFP no genoma.** Animais testados quanto à inserção do transgene GFP: 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11 e 12. Animais controles negativo (C57Bl/6 selvagem) e positivo (C57Bl/6 GFP), respectivamente: 5 e 6. Brancos: 7 e 13.

Conforme demonstrado, 6 animais (1, 2, 3, 4, 8 e 10) apresentaram integrados randomicamente em seu genoma o gene eGFP, com distintos números de cópias de integração. Entretanto, quando os mesmos foram submetidos à fenotipagem para verificar o padrão de expressão dos mesmos, não foi evidenciada expressão da GFP em nenhum dos animais Fundadores.

Esses resultados se repetiram em todos os vinte e dois animais (72%) que apresentavam bandas resultantes da genotipagem (Tabela 6).

**Tabela 6: Número de animais genotipados positivos para GFP em função dos diferentes promotores.**

<b>Promotores</b>	<b>Número de animais positivos para GFP</b>
Ubiquitina-C	12 (18)
Alfa miosina cardíaca	6 (7)
Fmtie	4 (6)
<b>Total</b>	<b>22 (31)</b>

O número de embriões submetidos à microinjeção subzonal em função dos distintos promotores utilizados estão sumarizados na tabela 7. Não foi evidenciado nenhuma diferença significativa entre os parâmetros analisados nesta tabela.

**Tabela 7: Número de embriões microinjetados em função dos diferentes promotores.**

<b>Promotores</b>	<b>Número de embriões microinjetados</b>
Ubiquitina-C	681
Alfa miosina cardíaca	537
Fmtie	405
<b>Total</b>	<b>1623</b>

## 7 DISCUSSÃO

A resposta das fêmeas ao tratamento superovulatório é muito variável entre os indivíduos (KAGABU & UMEZU, 2006). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens confrontadas, visualizados especialmente no largo desvio-padrão das médias obtidas. Similares resultados quanto a variação a resposta ao tratamento superovulatório em camundongas, foram encontrados por Maffilli e colaboradores (2003). Isso influencia diretamente na qualidade dos embriões coletados e, subseqüentemente, na viabilidade dos mesmos na geração de organismos geneticamente modificados.

Outro fator que interfere nos resultados alcançados para gerar animais transgênicos é a escolha da linhagem de camundongo a ser utilizada (HAZZARD, 1991). O grau de expressão e a detecção do transgene pode diferenciar significamente em virtude das características genéticas da mesma, se homocigota, heterocigota ou híbrida.

A linhagem híbrida F1 C57Bl/6 x BALB/c apresentou, nesse estudo, uma tendência a melhores resultados em detrimento da linhagem isogênica C57Bl/6, especialmente quanto à viabilidade dos embriões a microinjeção e implantação no útero. Este resultado também verificado em um estudo por Manasterky e Geistfeld, em 2002, onde os embriões híbridos, resultante do cruzamento de linhagens isogênicas – C57Bl/6 X SJL, C57Bl/6 X DBA2, C57Bl/6 X C3H e, C57Bl/6 X CBA – apresentaram melhores características, como alta taxa de sobrevivência embrionária *in vitro* e *in vivo* e taxas relativamente altas de integração e retenção do transgene.



Brinster e colaboradores em 1985, ao analisar os fatores que afetam a eficiência de integração do transgene em zigotos de camundongos microinjetados, concluíram que as linhagens híbridas devem ser escolhidas para gerar embriões para a microinjeção.

Devido à natureza randômica da inserção do transgene após a microinjeção dos vetores lentivirais no espaço perivitelino dos zigotos, cada Fundador resultante contém o transgene inserido em diferentes sítios em seu genoma. Este efeito de posição pode profundamente afetar a expressão do transgene e dos genes endógenos, sob os quais elementos regulatórios poderiam ter sido interrompidos por um evento de inserção (ZEISS, 2004). O transgene geralmente integra em disposição linear, resultando em variáveis níveis de expressão do gene. Além disso, o sítio de integração cromossomal pode afetar a função regulatória do elemento transcricional com o “construct” e, por conseguinte, a integração aleatória, pode interromper genes endógenos (mutagênese insercional), mudando o padrão de metilação do DNA do hospedeiro que, por conseguinte, altera as interações DNA-proteína e, interferir coma correta ativação de genes durante o desenvolvimento embrionário – silenciamento gênico (JAHNER & JAENISCH, 1985). Essas afirmativas podem explicar a ausência de expressão do GFP nos 22 animais que apresentavam o transgene integrado em seu material genético.

Por conseguinte, na transferência de genes mediada por vírus, o número de provírus integrados ao genoma varia substancialmente de animal para animal. Isso é devido a dificuldade em controlar o volume de vírus injetados no espaço subzonal. Isso está de acordo com os nossos resultados, nos quais verificou-se uma elevada variação do número de cópias inseridas

entre os animais genotipados. Lois e colaboradores (2002) verificaram que o locus específico no genoma em que um provirus é integrado afeta a atividade transcripcional de alguns transgenes derivados por este método. A expressão do GFP em animais com um único sítio de integração, não era observada por visualização direta, porém somente detectada por Western Blot em alguns poucos tecidos (cérebro e testículos), em detrimento de outros (coração, pulmões, rim, fígado, músculo esquelético e baço).

Estudando o impacto da expressão da proteína fluorescente verde no desenvolvimento embrionário de camundongos cultivados *in vitro* após a transgenia para expressão adicional da referida proteína, Devgan e colaboradores (2004), observaram que os embriões com baixo nível de expressão do GFP mostraram máximo desenvolvimento embrionário, em contraste com o pobre desenvolvimento embrionário para blastocistos dos embriões que apresentavam alto nível de expressão da proteína. O baixo desenvolvimento embrionário para blastocistos foi atribuído a alguma mutagênese adicional ou a repressão de algum gene essencial ao desenvolvimento embrionário endógeno, devido a hiperexpressão do transgene, assim como a maior vulnerabilidade dos embriões no estágio de pré-implantação a uma possível embriotoxicidade devida a hiperexpressão do GFP. É possível que esses achados expliquem as elevadas taxas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* dos embriões híbridos que resultaram em animais com o transgene integrado, entretanto sem expressão.

Por conseguinte, no mesmo estudo, os autores atribuíram que o alto número de cópias do GFP em um único locus no genoma poderia ser responsável pelo silenciamento gênico induzido pela repetição. As múltiplas

integrações do DNA do provirus também influenciam de forma substancial a expressão do transgene que ele carrega (IKAWA et al., 2003).

Ao cultivar os zigotos microinjetados, a fim de verificar a viabilidade *in vitro* dos mesmos e, quantificar a porcentagem de animais positivos a expressão da proteína fluorescente verde nos estágios embrionários subsequente ao desenvolvimento celular, foi evidenciado que os zigotos não entram em divisão celular. Esse fenômeno é descrito na literatura por bloqueio celular, ou “2-cell block *in vitro*” e, coincide com as modificações na síntese de RNA mensageiro, sugerindo que em camundongos, até o final do estágio de 2 células, o embrião está sob controle materno. O cultivo, então, provoca deficiências no citoplasma do zigoto não permitindo o seu desenvolvimento até os estágios subsequentes do desenvolvimento embrionário. Assim, os zigotos microinjetados foram após um curto período de cultura, foram diretamente inovulados em fêmeas pseudoprenhas a fim de não terem seu ciclo celular bloqueado.

Há todavia a possibilidade desses vetores provenientes do Instituto do Coração terem sofrido alguma alteração ou degeneração durante o transporte, armazenagem, assim como apresentarem algum fator intrínseco ou extrínseco que inviabilizou o processo de obtenção dos animais expressando o transgene.

Em virtude da potencialidade que esses animais podem fornecer para os estudos com transplante de células, como marcadores, especialmente na terapia celular, estudos subsequentes serão desenvolvidos, principalmente do que diz respeito ao treinamento para que as técnicas de desenvolvimento de vetores lentivirais ou outras metodologias de transgênese sejam implantadas em nossa instituição.

## 8 CONCLUSÕES

- A linhagem híbrida, F1 C57Bl/6 x BALB/c, apresentou uma tendência superior à resposta superovulatória, ao número médio de estruturas coletadas por fêmea superovulada e, ao número médio de estruturas coletadas por fêmea que respondeu ao tratamento superovulatório quando comparada à linhagem isogênica C57Bl/6.
- As fêmeas F1 apresentaram uma tendência à superioridade no tocante à obtenção de embriões viáveis após a microinjeção.
- Linhagens híbridas devem ser priorizadas como doadoras dos embriões para gerar camundongos transgênicos.
- A microinjeção subzonal de vetores lentivirais contendo o gene repórter para GFP, sob controle de diferentes promotores, gerou animais portando o transgene inserido randômicamente em seu genoma, entretanto sem expressão da proteína marcadora nos tecidos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. B. Molecular biology of the cell. New York, Garland Publishing, 1994.

ANAGNOSTAKIS, S. L., CHEN, B., GELEFKA, L.M, NUSS, D. L. Hypovirus Transmission to Ascospore Progeny by Field-Released Transgenic Hypovirulent Strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 88(7): 598-604, 1998;

BABINET, C. Transgenic mice: na irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11:88-94, 2000;

BANTOUNAS, I., PHYLACTOU, L. A., UNEY, J. B. RNA interference and the use of small interfering to study gene function mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33: 545-557, 2004;

BAPTISTA, H. A., MOTTA, F. L. T., AZZOLINI DE MELO, A., I Curso Teórico-Prático de Transgênese em Camundongo, Universidade Federal de São Paulo – CEDEME, 28p. 2008.

BEHBOODI, E., ANDERSON, G. B., HORVAT, S., MEDRANO, J. F., MURRAY, J. D., ROWE, J. D. Microinjection of bovine embryos with a foreign gene and its detection at the blastocyst stage. *Journal of Dairy Science*, 76(11), 3392-3399, 1993;

BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia. Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995. Regulamenta os incisos II e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados, autoriza o Poder Executivo a criar, no âmbito da Presidência da República, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e dá outras providências.

**Diário oficial da União**, de 06/01/1995, Seção 1, página 337;

BRINSTER, R. L. CHEN, H. Y., TRUMBAUER, M. E., SENEAR, A. W., WARREN, R., PALMINTER, R. D. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27:223-231, 1981;

BRINSTER, R. L., CHEN, H. Y., TRUMBAUER, M. E., YAGLE, M. K., PALMINTER, R. D. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 4438-4442, 1985;

BRINSTER, R. L., ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 11298-11302, 1994;

BRINSTER, R. L., AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 11303-11307, 1994;

CAMPBELL, K. H. S., RITCHIE, W. A., FERRIER, P. M. Nuclear transfer from an established cell line. *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, second edition, Academic Press, vol. 3, 1998;

CHAN, A. W. S. Transgenic animals: current and alternative strategies. *Cloning*, 1(1):25-46, 1999;

CHOI, Y., OK, D., KNOW, D., CHUNG, J., KIM, H., YEO, S., KIM, T., SEU, H., KIM, J. Murine male germ cell apoptosis induced by bulsulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL and p53 independent manner. *FEBS Letter*, 575: 41-51, 2004;

CIABATTINI, A., PETTINI, E., ANDERSEN, P., PAZZI, G., MEDAGLINI, D. Primary activation of antigen-specific naive CD4+ and CD8+ T cells following intranasal vaccination with recombinant bacteria. *Infection and Immunity*, 76(12): 5817-5825, 2008;

COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(11): 3240-3244, 1973;

COOK, D. N., WHITEHEAD, G. S., BURCH, L. H., BERMAN, K. G., KAPADIA, Z., WOHLFORD-LENANE, C., SCHWARTZ, D. A. Spontaneous mutations in recombinant inbred mice: mutant toll-like receptor 4 (Tlr4) in BXD 29 mice. *Genetics*, 172: 1751-1755, 2006;

COX, R. D., BROWN, S. D. M. Rodent models of genetics disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 278-283, 2003;

CUBITT, A. B., HEIM, R., ADAMS, S. R., BOVD, A. E., GROSS. L. A., TSIEN, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS*, 20: 448-455, 1995;

DAI, S., WEI, X., ALFONSO, A. A., PEI, L., DUQUE, U. G., ZANG, Z., BABB, G. M., BEACHY, R. N. Transgenic rice plants that overexpress transcription factors RF2a and RF2b are tolerant to rice tungro virus replication and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(52): 21012-21016, 2008;

DESROSIERS, R. C. Nonhuman lentiviruses. In: HOWLEY, P. M., KNIPE, D. M., GRIFFIN, D., LAMB, R. A., MARTIN, A., ROIZMAN, B., STRAUS, S. E., editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lppincott-Raven Publishers, p. 2095-2121, 2001;

DEVGAN, V., RAO, M. R. S., SESHAGIRI, P. B. Impact of embryonic expression of enhanced green fluorescent protein on early mouse development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313:1030-1036, 2004;

EVANS, M. J., KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819): 154-156, 1981;



EVANS, M. Tissue culture of embryonic stem cells. Cell Biology: a Laboratory Handbook, second edition, Academic Press, vol. 3, 1998;

FIRE, A. XU, S. MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669): 806–811, 1998

FUKAMIZU, A. Transgenic animals in endocrinological investigation. J Endocrinol Invest. 16(6): 461-473, 1993;

GAGNE, M., POTHIER, F., SIRARD, M-A. Eletroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes, Mol Reprod Devel, 29:6-15, 1991;

GARDNER, R. L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. Nature, 220(5167): 596-597, 1968;

GEURTS A. M., WILBER, A., CARLSON, C. M, LOBITZ, P.D., CLARK K. J., HACKETT, P. B., McIVOR, R. S., LARGAESPADA, D. A. Condicional gene expression in the mouse using a Sleeping Beauty gene-trap transposons. BMC Biotechnol, 6:30, 2006.

GIRALDO, P., MONTOLIU, L. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. Transgenic Research, 10:83-103, 2001;

GODARD, A. L. B., GUÉNET, J. Genética de camundongos. Modelos animais de doenças humanas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 9:96-100, 1999;

GOSSLER, A., DOETSCHMAN, T., KORN, R., SERFLING, E., KEMLER, R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cells lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(23): 9065-9069, 1986;

GORDON, J. W., SCANGOS, G. A., PLOTKIN, D. J., BARBOSA, J. A., RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77(12): 7380-7384, 1980;

GORDON, J. W. Production of transgenic mice by pronuclear microinjection. Cell Biology: a laboratory handbook, 2<sup>a</sup>ed, v. 3, 1998;

GREGORY, S.G., SEKHON, M., SCHEIN J., ZHAO S., OSOEGAWA K., SCOTT C.E., EVANS R.S., BURRIDGE P.W., COX T.V., FOX C.A., HUTTON R.D., MULLENGER I.R., PHILLIPS K.J., SMITH J., STALKER J., THREADGOLD G.J., BIRNEY E., WYLIE K., CHINWALLA A., WALLIS J., HILLIER L., CARTER J., GAIGE T., JAEGER S., KREMITZKI C., LAYMAN D., MAAS J., MCGRANE R., MEAD K., WALKER R., JONES S., SMITH M., ASANO J., BOSDET I., CHAN S., CHITTARANJAN S., CHIU R., FJELL C., FUHRMANN D., GIRN N., GRAY C., GUIN R., HSIAO L., KRZYWINSKI M.,

KUTSCHE R., LEE S.S., MATHEWSON C., MCLEAVY C., MESSERVIER S., NESS S., PANDOH P., PRABHU A.L., SAEEDI P., SMAILUS D., SPENCE L., STOTT J., TAYLOR S., TERPSTRA W., TSAI M., VARDY J., WYE N., YANG G., SHATSMAN S., AYODEJI B., GEER K., TSEGAYE G., SHVARTSBEYN A., GEBREGEORGIS E., KROL M., RUSSELL D., OVERTON L., MALEK J.A., HOLMES M., HEANEY M., SHETTY J., FELDBLYUM T., NIERMAN W.C., CATANESE J.J., HUBBARD T., WATERSTON R.H., ROGERS J., DE JONG P.J., FRASER C.M., MARRA M., MCPHERSON J.D., BENTLEY D.R. A physical map of the mouse genome. *Nature* 418(6899):743-750, 2002.

HACKETT, P. B., EKKER, S. C., LARGAESPADA, D. A., MCIVOR, R. S. Sleeping Beauty Transposon-Mediated Gene Therapy for prolonged Expression. *Non-viral Vectors for Gene Therapy*, 2<sup>o</sup> edition, 52p., 2004;

HAMRA, F. K., GATLIN, J., CHAPMAN K. M., GRELLESL D. M., GARCIA, J. V., HAMMER, R. E., GARBERS, D. L. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23):14931-14936, 2002;

HAZZARD, D. G. Relevance of the rodent model to human aging studies. *Neurobiol Aging*, 12:645-649, 1991;

HICKMAN, J. M., DAVIS, I. C. Transgenic mice. *Paediatric Respiratory Reviews*, 7:49-53, 2006;

HIRABAYASHI, M., TAKAHASHI, R., ITO, K., KASHIWAZAKI, N., HIRAO, M., HIRASAWA, K., HOCHI, S., UEDA, M. A comparative study on the integration

of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit and pig genomes. *Exp. Anim.*, 50(2): 125-131, 2001;

HOCHI, S., HIRABAYASHI, M. Maintenance of transgenes in rats: the contributions of embryo cryopreservation and intracytoplasmic sperm/spermatid injection. *Journal of Reproduction and Development*, 48(3): 205-213, 2002;

HOUDEBINE, L. Animal transgenesis: recent data and perspectives. *Biochimie*, 84: 1137-1141, 2002a;

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

IKAWA, M., TANAKA, N., KAO, W. -Y., VERMA, I. M. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Molecular Therapy*, 8(4): 666-673, 2003;

JACKSON, D. A., SYMONS, R. H., BERG, P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 69(10): 2904-2909, 1972;

JAENISCH, R., MINTZ, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA healthy adult mice from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 71(4): 1250-1254, 1974;

JAENISCH, R., FAN. H., CROKER, B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72(10): 4008-4012, 1975;

JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73(4): 1260-1264, 1976;

JAHNER, D., JAENISCH, R. Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. Nature, 315:594-597, 1985;

KAGABU, S.; UMEZU, M. Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of Wistar-Imamichi Adult Rats superovulated with eCG-hCG. *Exp. An.*, v.55, p.45-48, 2006;

KANATSU-SHINOHARA, M., SHINOHARA, T. Culture and genetic modification of mouse germline stem cells. Annals of the New York Academy of Science, 1120: 59-71, 2007;

KANG, Y. K., KOO, D. B., PARK, J. S., CHOI, Y. H., CHUNG, A. S., LEE, K. K., HAN, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.*, 28:173-177, 2001;

KARLSSON, C., PINES, J. Green fluorescent protein. *Cell Biology: a laboratory handbook*, second edition, v. 4, p. 246-252, Academic Press, 1998;

KISPERT, A., GOSSLER, A. Introduction to early mouse development. In: HEDRICH, A. *The Laboratory Mouse (Handbook of experimental animals)*, Elsevier Academic Press, 575p., 2004;

KISSEBERTH, W. C.; BRETTINGEN, N. T.; LOHSE, J. K.; SANDGREN, E. P. Ubiquitous Expression of Marker Transgenes in Mice and Rats. *Development Biology*, 214:128-138, 1999;

KUHN, R., STREIF, S., WURST, W. RNA interference in mice. *Handb Exp Pharmacol*, 178: 149-176, 2007;

LEE, G. S., HIM, H. S., HYUN, S. H., LEE, S. H., JEON, H. Y., NAM, D. H., JEONG, Y. W., KIM, S., HAN, J. Y., AHN, C., KANG, S. K., LEE, B. C., HWANG, W. S. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, 63(4):973-991, 2005;

LEUNG, R. K. M., WHITTAKER, P. A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107: 222-239, 2005;

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*, 295(5556): 868-872, 2002;

LU, P. Y., XIE, F., WOODLE, M. C. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet.*, 54: 117-142, 2005;

MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.A.; CARVALHO, G.R. et al. Efeito do horário de aplicação e dosagem de somatotropina bovina recombinante sobre o número, qualidade e taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões obtidos de camundongas superovuladas. *Rev. Bras. Reprod. An.*, v.27, p.684-689, 2003;

MANASTERSKY, G. M., GEISTFELD, J. G. Transgenic and Knockout Mice. Chapter 28: 1129-1141. In: FOX, J. G., ANDERSON, L. C., LOEW, F. M., QUIMBY, F. W. *Laboratory Animal Medicine*, segunda edição, Academy Press, 2002;

MANSOURI, A. Gene targeting by homologous recombination in embryonic stem cells. *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, second edition, Academic Press, vol. 3, 1998;

MCCLINTOCK, B. Nobel prize to Barbara McClintock. *Nature*, 305(5935): 575, 1983;

MCLEAN, D. J. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res.*, 322(1): 21-31, 2005;

MILLER, D. G., ADAM, M. A., MILLER A. D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*, 10: 4239-4242;

MIYOSHI, H., BLOMER, U., TAKAHASHI M., GAGE, F. H., VERMA, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol*, 72:8150-8157, 1998;

MOREIRA, P. N., GIRALDO, P., COZAR, P., POZUETA, J., JIMÉNEZ, A., MONTOLIU, L., GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction*, 71: 1943-1947, 2004;

MOREIRA, P. N., PÉREZ-CRESPO, M., RAMIREZ, M. A., POZUETA, J., MONTOLIU, L., GUTIERREZ-ADAN, A. Effect of transgene concentration, flanking matrix attachment regions, and RecA-coating on the efficiency of mouse transgenesis mediated by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, 76(2):336-343, 2007a;



MOREIRA, P. N., POZUETA, J., PÉREZ-CRESPO, M., VALDIVIESO, F., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., MONTOLIU, L. Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Research*, 16:163-168, 2007b;

NAGY, A., VINTERSTEN, K. Murine embryonic stem cells. *Methods in enzymology*, 418: 3-21, 2006;

NOTTLE, M. B., HASKARD, K. A., VERMA, P. J., DU, Z. T., GRUPEN, C. G., MCILFATRICK. Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. *Transgenic Res*, 10(6): 523-531, 2001;

OGAWA, T. Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. *Journal of Molecular Medicine*, 79(7): 368-74, 2001;

ORBAN, P. C., CHI, D., MARTH, J. D. Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15): 6861-6865, 1992;

OLIVEIRA DOS SANTOS, A. J., Animais Transgênicos e nocautes: soluções para muitos enigmas. *Ciência Hoje*, 25(146): 16-24, 1999;

ORLIC, D.; WILL, J. M.; ARAI, A. E. Stem cells for myocardial regeneration. *Circulation Research*, 91(12):1092-1102, 2002;

PALMINTER, 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 development from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300 (5893): 611-615, 1982;

PEREIRA, M. S. O. Transgênese Animal. *Biotecnologia Ciência & desenvolvimento – Encarte Especial, Brasil*, vol. 4, 1998. Disponível em: [www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br). Acessado em: <11 de novembro de 2008;

PESQUERO, J. B., BAPTISTA, H. A., MOTTA, F. L. T., OLIVEIRA, S. M. Aplicações dos animais transgênicos. *Scientific American Brasil*, 56, 2007. Disponível em: [http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/aplicacees\\_dos\\_animais\\_transgenicos.html](http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/aplicacees_dos_animais_transgenicos.html). Acessado em: 18 de outubro de 2008;

PFEIFER, A., IKAWA, M., DAYN, Y., VERMA, M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4):2140-2145, 2002;

PFEIFER, A. Lentiviral trasngenesis. *Transgenic Research*, 13:513-522, 2004;

PLATT, J. L., LIN, S. S. The future promises of xenotransplantation. *Annals of the New York Academic of Sciences*, 862:5-18, 1998;

POPOVA, E., KRIVOKHARCHENKO, A., GANTEN, D., BADER, M. Efficiency of transgenic rat production of transgene-construct and overnight embryo culture. *Theriogenology*, 64: 1441-1453, 2004;

PROLLA, T.A., BAKER, S. M., HARRIS, A. C., TSAO, J., YAO, X., BRONNER, C. E., ZHENG, B., GORDON, M., RENEKER, J., ARNHEIM, N., SHIBATA, D., BRADLEY, A., LISKAY, L. M. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nature Genetics*, 18: 276-279, 1998;

QUIAN, J., LIU, Y., JIANG, M., MEKONNEN, T., WANG, K. A novel and effective method to generate transgenic mice and chickens: linker-based sperm mediated gene transfer. *J Anim Sci*, 79 (Suppl 1):33, 2001;

RICHA, J., LO., C. W. Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected chromosome fragments. *Science*, 245(4914):175-177;

RICHARDSON, A., HEYDARI, A. R., MORGAN, W. W., NELSON, J. F., SHARP, Z. D., WALTER, C. A. Use of Transgenic Mice in Aging Research. *ILAR Journal Online*. 38(3), 1997. Disponível em:<[http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarjournal/38\\_3/38\\_3Transgenic.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/38_3/38_3Transgenic.shtml)>. Acessado em: 22 de dezembro de 2008;

RITCHIE, W. A., NEIL, C., KING, T, BRUCE, C., WHITELOW, A. Transgenic embryos and mice produced from low titre lentiviral vectors. *Transgenic Res*, 16:661-664, 2007;

ROBL, J. M., WANG, Z., KASINATHAN, P., KUROIWA, Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, 67:127-133, 2007;

ROSSANT, J., SPENCE, A., Quimeras and mosaics in mouse mutant analysis. *Trends genet.* 14:358-363, 1998;

RUBINSON, D. A., DILLON, C. P., KWIATKOWSKI, <sup>a</sup> V., SIEVERS, C., YANG, L., KOPINJA, J., ZHANG, M., McMANUS, M. T., GERTLER, F. B., SCOTT, M. L., PARIJS, L. V. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics*, 53:401-406, 2003;

RUMPF, R., MELO, E. O. Produção de animais transgênicos: metodologias e aplicações. Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 – 0110; 145, Brasília, 27p, 2005;

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ, 388p, 2002;

SHASTRY, B. S. Gene disruption in mice: models of development and disease. Mol Cell Biochem, 181(1-2): 163-179, 1998;

SIN, F. Y., WALKER, S. P., SYMONDS, J. E. MUKHERJEE, U. K. KHOO, J. G. SIN, I. L. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability and fate of transgene. Mol Reprod Dev, 56:285-288, 2000;

SINGER, O., TISCORNIA, T., IKAWA, M., VERMA, I. M. Rapid generation of knockdown transgenic mice by silencing lentiviral vectors. Nature Protocols, 1(1): 286-292, 2006;

TAMURA, T., THIBERT, C., ROYER, C., KANDA, T., ABRAHAM, E., KAMBA, M., KOMOTO, N., THOMAS, J. L., MAUCHAMP, B., CHAVANCY, G., SHIRP, P., FRASER, M., PRUDHOMME, J. C., COUBLE, P. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyback transposon-derived vector. Nat. Biotech., 18:81-84, 1999;

TIJSTERMAN, M. KETTING, R. F., PLASTERK, R. H. The genetics of RNA silencing. Annu Rev Genet, 36:489-519, 2002;

TISCORNIA, G., SINGER, O., VERMA, I. M. Production and purification of lentiviral vectors. Nature Protocols, 1(1):241-245, 2006;

TOMHAS, K. R., CAPECCHI, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell, 51(3):503-512, 1987;

URASAKI, A., ASAKAWA, A., KAWAKAMI, K. Efficient transposition of the Tol2 transposon element from a single-copy donor in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50): 19827-19832, 2008;

WAKAYAMA, T., YANAGIMACHI, R. Cloning the laboratory mouse. *Cell & Developmental Biology*, 10:253-258, 1999;

WALL, R. J. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology*, 45:57-68, 1996;

WALL, R. J. Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells*, 3(4): 209-220, 2001;

WALL, R. J. New gene transfer methods. *Theriogenology*, 57:188-201, 2002;

YANG, P., WANG, J., GONG, G., SUN, X., ZHANG, R., DU, Z., LIU, Y., LI, R., DING, F., TANG, B., DAY, Y., LI, N. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS ONE*, 3(10):e3453, 2008;

ZEISS, C. Phenotyping of genetically altered mice. In: REUTER, J.D., SUCKOW, M. A. *Laboratory manual Medicine and management*. Publisher:

International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA, 2004;

ZERBINI, F. M., ALFENAS, P. F., ANDRADE, E. C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas contra vírus. RAAP, 13: 191-244, 2005;

ZHANG, Y. NASH, L., FISHER, A. L. A simplified, robust, and streamlined procedure for the production of *C. elegans* transgenes via recombineering. *BMV Developmental Biology*, 8(1):119 [Epub ahead of print], 2008;