MARIANA IANELLO GIASSETTI

**Modelos para a produção de eritropoietina recombinante humana *in vivo*
e *in vitro* com vetores plasmideais em ovinos**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo

2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2417
FMVZ

Giasseti, Mariana Ianello

Modelos para a produção de eritropoietina recombinante humana *in vivo*
e *in vitro* com vetores plasmídeos em ovinos / Mariana Ianello Giasseti. --
2011.

143 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal,
São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

1. Eritropoietina recombinante humana. 2. Célula mamária. 3. Proteínas
do leite. 4. Biorreatores. 5. Ovelha. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modelos para a produção de eritropoietina recombinante humana *in vivo* e *in vitro* com vetores plasmídeos em ovinos", protocolado sob o nº1663/2009, utilizando 06 (seis) ovelhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Visintin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Models for the production of human recombinant erythropoietin *in vivo* and *in vitro* with plasmidial vectors in ovine", utilizing 06 (six) ovine, protocol number 1663/2009, under the Prof. Dr. José Antonio Visintin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GIASSETTI, Mariana Ianello

Título: Modelos para a produção de eritropoietina recombinante humana *in vivo* e *in vitro* com vetores plasmideais em ovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

*À Deus,
Aos meus pais,
À minha irmã,
À minha tia,*

*À Camilla,
À Flavia,
À Renata,
Muito Obrigada!!!*

*Meu pai chama João Gato,
Minha mãe Gata Maria,
Meus irmãos são todos gatos,
Ai meu Deus que gataria.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu avô Orlando pelo exemplo de vida e dedicação. Aos meus grandes amores, meus pais José e Sandra, por simplesmente serem a minha base, por todo o amor e o apoio incondicional. A minha segunda mãe, tia Josefina, pelo amor de todos os dias. À minha irmã Laura por ser a melhor irmã do mundo. Preta, obrigada por todos os conselhos, chazinhos, carinho e apoio. À toda a minha família, por cada um, com seu jeitinho, participar da minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Visintin, por me mostrar como é importante a paixão pelo que se acredita e a coragem de lutar por seus ideais. Muito obrigada por confiar em mim, possibilitando meu aprendizado e a convivência com família VRA. A minha “co-orientadora” Mayra, por ser simplesmente ela mesma, pela sua dedicação total ao nosso grupo de trabalho e ao laboratório. Obrigada por mostrar-me que sempre é possível deixar tudo melhor e incentivando, mesmo que de forma inconsciente, o meu sonho pela vida acadêmica. Ao meu ex-orientador, Mario Binelli, por iniciar minha curiosidade científica. A pesquisadora Elizabeth Martins por me acolher em seu grupo de pesquisa e laboratório e sempre me ajudar.

Gostaria de agradecer a amizade e ajuda de todos da equipe da pesquisadora Elizabeth Martins, especialmente à Erika, Dani e a Cláudia. Meninas, muito obrigada pela dedicação em me ajudar e a solucionar todos os problemas, vocês são realmente especiais.

À Camilla, por onde começar? Mulher versátil, mãe, grande amiga e incrível pesquisadora! Muito obrigada por me agüentar durante tanto tempo, ser minha “co-orientadora”, pelos abraços e conselhos. À Flávia por ser sempre um exemplo, desde os remotos tempos do Mario! Muito obrigada pela sua disposição em sempre me ajudar na hora de resolver as “buchas” e o mais importante, sempre de bem com a vida, notório pelas piadinhas no meio das correções! Gostaria de agradecer também outra grande amiga, Profa. Renata! Rê “Mosqueteira”, muito obrigada por ser meu modelo de dedicação tanto ao trabalho quanto a vida e principalmente ao próximo. Você me mostrou o quanto é bom fazer e se sentir parte de um grupo, um por todos e todos por um! Gostaria de agradecer de forma muito especial ao Marcílio, não só por me ajudar na fatídica estatística, mas principalmente por

dedicar-se tanto à família VRA, fazendo com que os laços de amizade sejam cada vez mais intensos.

Ao meu amigo Fura! Xuxuo, muito obrigada por sua amizade nos últimos sete anos, pelas risadas e que risadas, pelo companheirismo, pela autenticidade e pela alegria que sempre fez os problemas ficarem menores. Obrigada por ser simplesmente você! Fê, muito obrigada pela sua amizade a qual sei que posso contar sempre, não porque trabalhamos e moramos juntas, mas simplesmente por que é verdadeira. Obrigada pelas risadas e por me tornar uma pessoa mais saudável! Xum, obrigada por me dar a honra de ser sua amiga. Você realmente especial, te admiro muito pela sua força e amor à vida. Fe, agora a Loira, muito obrigada por me mostrar que a vida é mais simples do que imaginamos, a sua amizade é realmente iluminada! Xuxu Giana, você é uma pessoa muito especial e daquelas companheiras mesmo, agradeço por te chamar de amiga desde tempos da EJAV! Jú, muito obrigada por sempre me acalmar enquanto as células morriam e sempre comemorar quando as coisas davam certo! Obrigada por sua alegria e por ser um modelo de força e superação.

Gostaria de agradecer a todos que fazem ou já fizeram parte do nosso grupo de trabalho e amizade. Alê muito obrigada por ser um exemplo de empenho. Ainda lembro-me do seu jeito especial de me acolher em meu primeiro dia de estágio. Mari, quando crescer, quero ser como você. Maran, obrigada por mostrar que é possível conciliar família e trabalho de uma forma mais do que harmônica. Weber, obrigada pelos conselhos e conversas. Marcelo (Febém), muito obrigada pelas idéias e por sempre solucionar as minhas dúvidas por mais básicas que fossem. Zequinha obrigada pela amizade e alegria, suas piadas fazem os dias mais felizes. Paulo, Everton, Samir, Robinson, Rafa, Thaís, Pedro, Marcinha, Alberto e Maira muito obrigada pela ajuda na realização desse trabalho e pela amizade. Fabíola e Maza, obrigada por serem excelentes professoras e pesquisadoras. Também gostaria de agradecer a Prof. Camila e suas Meninas (Cris, Fer e Liege) muito obrigada pela amizade e força. Vocês são meus exemplos de amor, fraternidade e amizade. Adoro o jeitinho especial de cada uma de vocês.

Gostaria de agradecer aos funcionários do VRA, Harumi, Thais, Alice, Anderson e Miguel, pela ajuda, colaboração e eficiência. Sem vocês esse trabalho não se concretizaria. Ao Irailton, Belau e Luis, muito obrigada pela ajuda e por se dedicarem tanto aos animais do Departamento. As funcionárias da biblioteca, em

especial a Elza e Helena. A paciência e dedicação de vocês fazem a nossa vida muito mais tranquila.

Gostaria de agradecer ao Marcelo e a Prof. Malú que se prontificaram imediatamente a me ajudar na execução da eletroporação e confecção do eletrodo.

Gostaria de agradecer também os meus amigos Fiapo, Tamps e Guapa que participaram diariamente de todas as minhas frustrações e conquistas, sempre me ouvindo, aconselhando e me dando forças. Galera, sou fã de vocês e tenho certeza que irão arrasar nessa nova fase. A amizade de vocês se tornou, ao longo desses dois anos, algo muito forte e especial.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E por último, mas não menos importante, agradeço aos animais que participaram desse trabalho. **Bochecha, BMW e Preta**, vocês é quem brilham!

*" Listen to what I say,
In your life expect some trouble,
When you worry you make it double,
Don't worry be happy,
Be happy now"*

(Robert McFerrin Jr)

RESUMO

GIASSETTI, M. I. **Modelos para a produção de eritropoietina recombinante humana *in vivo* e *in vitro* com vetores plasmídeos em ovinos.** [Models for the production of human recombinant erythropoietin *in vivo* and *in vitro* with plasmidial vectors in ovine]. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Para produção de biofármacos protéicos, como a eritropoietina recombinante humana (EPOrh), são necessárias alterações pós-traducionais adequadas que garantam a sua especificidade e atividade biológica. Essas características são obtidas apenas em biorreatores baseados em células eucarióticas, como as da glândula mamária. Sistemas baseados nesse tipo celular, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, já são utilizados para produção estratégica e viável de proteínas recombinantes biologicamente ativas. Assim, tanto o estabelecimento de novas linhagens de células mamárias que apresentem boa expressão protéica quanto o desenvolvimento de sistemas *in vivo* que utilizem a estrutura da glândula mamária para essa produção de proteínas recombinantes são de grande valia. O presente trabalho teve como objetivo comparar dois métodos de estabelecimento de uma cultura de células de glândula mamárias ovinas, enzimático e não enzimático, e verificar sua capacidade de expressão das proteínas do leite β -lactoglobulina, α -caseína, β -caseína e κ -caseína mediante o tratamento com SFB (soro fetal bovino) ou SOL (soro de ovelha lactante), na presença ou não de Matrigel. Para isso, foi realizado um experimento *in vitro*, no qual foi estabelecido o cultivo celular até a passagem 12 (P12) de duas linhagens celulares: digerida (LD) e não digerida (LND). Para a LD na P12 foi observado apenas um tipo celular, o qual era positivo para a marcação com vimentina. Essa linhagem apresentou expressão gênica de β -caseína e β -lactoglobulina apenas quando tratada com meio de cultivo acrescido de SFB, sendo a expressão inferior ($P=0,001$) ao grupo da LND submetido ao mesmo tratamento. Já a LND, quando tratada com meio adicionado com SFB expressou κ -caseína além da β -caseína e β -lactoglobulina. A troca do SFB do meio de cultivo por SOL aumentou a expressão gênica de β -lactoglobulina ($P=0,001$) para ambas linhagens. Foi realizada a curva de crescimento para LD e LND na P12 com o meio

de cultivo acrescido com SFB ou SOL. Para a LND observou-se o efeito do meio na velocidade de crescimento celular, sendo que foi maior para o grupo tratado com SFB ($P < 0,05$). Para a LD, não ocorreu o efeito do meio na velocidade de crescimento celular ($P > 0,05$), não sendo observada diferença com a LND tratada com SOL ($P > 0,05$). A LND apresentou marcação positiva para a presença de vimentina e citoqueratina. Este trabalho visou, ainda, estabelecer um sistema de produção da EPOrh no leite de ovelhas não transgênicas pela técnica de infusão intra-mamária *in vivo* de dois plasmídeos diferentes e verificar a secreção qualitativa desta proteína por Western-blotting. Assim, foi feito um experimento *in vivo* no qual glândulas mamárias de ovelhas foram transfectadas com dois plasmídeos diferentes: ALAC ($n=2$), BGL ($n=2$) e controle negativo ($n=2$). Após a infusão dos plasmídeos, foi realizada a eletroporação de cada teto (3 choques de 500 volts com a duração de 15ms cada, sendo realizada a inversão da polaridade). Os animais foram ordenhados durante 20 dias após a transfecção, porém não foi possível detectar a presença de EPOrh nas amostras de leite analisadas. O limiar de detecção do teste utilizado foi de 67,5pg de EPOrh (Eritromax®) em leite controle negativo de ovelha. Concluindo, foi possível estabelecer o cultivo *in vitro* das LD e LND com capacidade de expressar proteínas do leite, sendo a expressão da β -lactoglobulina aumentada pelo tratamento com SOL. Ambas as linhagens apresentaram marcação positiva para vimentina, mas apenas LND para citoqueratina. Ainda, para o experimento *in vivo*, não foi possível detectar a expressão de EPOrh no leite das ovelhas transfectadas com os plasmídeos ALAC e BGL.

Palavras-chave: Eritropoietina recombinante humana. Célula mamária. Proteínas do leite. Biorreatores. Ovelha.

ABSTRACT

GIASSETTI, M. I. **Models for the production of human recombinant erythropoietin in vivo and in vitro with plasmidial vectors in ovine.** [Modelos para a produção de eritropoietina recombinante humana in vivo e in vitro com vetores plasmídeos em ovinos]. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Some post-translational modifications are necessary for the production of biopharmaceutical proteins, such as recombinant human erythropoietin (rhEPO), with a good specific action and a high biological activity. These modifications are obtained only by bioreactors based on eukaryotic cell as mammary cells. Bioreactors, *in vivo* or *in vitro*, with this kind of cell have been used for a viable and strategic production of biologically active recombinant proteins. For this reason, the establishment of a new line of mammary cells with high milk protein expression and the development of systems for production of recombinant proteins by the mammary gland *in vivo* are essential studies. One of the main objectives of this study was to compare two methods, enzymatic and non-enzymatic, to establish ovine mammary cells culture and verify their gene expression of milk proteins such as β -lactoglobulin, α -casein, β -casein and κ -casein with different treatments: LOS (lactating ovine serum) or FBS (fetal bovine serum) added to the culture medium, in the presence or absence of Matrigel®. In this manner, an *in vitro* study was performed and the culture of two lines were established, digested (DL) and non-digested (NDL), of ovine mammary cell until the passage 12 (P12). In DL was observed just one cellular type that was positive for staining with vimentin. This cell line expressed β -lactoglobulin and β -casein genes with the FBS treatment and without Matrigel. The gene expression was lower ($P=0,001$) when compared to the NDL under the same conditions of culture. Then, the NDL expressed β -lactoglobulin, β -casein and κ -casein genes when treated with FBS without Matrigel. The treatment with LOS in the culture medium increased the gene expression of β -lactoglobulin for both cell lines. The growth curve was determined with both cell lines in P12 with FBS or LOS treatment. For the NDL, the type of medium had effect on the cell growth speed and was highest with the FBS treatment ($P<0,05$). However, the medium did not have effect on growth speed of LD

($P > 0,05$) and no difference was observed at the NDL treated with LOS ($P > 0,05$). The NDL was positive for staining with vimentin and cytokeratin. The second main objective of this study was to establish an *in vivo* system for the production of rhEPO in milk of non-transgenic ewes by the intra-mammary infusion of two different plasmids and verify the qualitative milk secretion of this protein by western-blotting. In this way, in the *in vivo* experiment ovine mammary glands were transfected with two different plasmids: ALAC (n=2), BGL (n=2) and negative control (n=2). Each half udder was filled with plasmid solution and three 3 electric pulses of 500 volts were applied for 15ms each, followed by another three pulses with reversed polarity. The three animals were milked for 20 days after transfection, nevertheless it was not possible to identify rhEPO in any milk sample. The test threshold to identify rhEPO (Eritromax®) in milk from a negative control animal was 67,5pg. In conclusion, the *in vitro* culture of NDL and DL was established up to the P12 with expression of milk protein and the LOS treatment increased the expression of β -lactoglobulin. The two cell lines culture were positive for staining of vimentina but only NDL was positive for cytokeratin. In the *in vivo* experiment, rhEPO secretion was not detected in the milk from ewes transfected with ALAC and BGL plasmids.

Key words: Recombinant human erythropoietin. Mammary cell. Milk proteins. Bioreactor. Ovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tri-dimensional da eritropoietina humana (<i>Protein Data Bank</i> , 2003).....	36
Figura 2 - Estrutura da cadeia glicídica da EPO (MELLADO, M. C. M., 2005).....	37
Figura 3 - Células secretórias da glândula mamária com proteínas e lipídios sendo liberados por exocitose. Presença de células mioepiteliais na porção basal das células secretórias (Adaptado de Junqueira e Carneiro.,2006).....	45
Figura 4 - Programação do ciclo (temperatura, tempo e quantidade de repetições) para as reações de PCR em tempo real - São Paulo – 2010.....	70
Figura 5 - Eletrodo construído para eletroporação de uma glândula mamária ovina - São Paulo – 2010.....	75
Figura 6 - Imagens representativas obtidas por microscopia óptica (Zeiss Axiovert S100) em aumento de 400 vezes pelo Programa Image Plus. A) Linhagem não digerida (LND em P4, observa-se a presença de dois tipos celulares; B) Linhagem digerida (LD) em P4; C) LND em P8, dois tipos celulares com a formação de aglomerados; D) LD em P8; E) LND em P12, estrutura semelhante à mamosfera e F) LD em P12, células delgadas e bem aderidas à placa de cultivo - São Paulo – 2010.....	83
Figura 7 - Imagens representativas obtidas por microscopia óptica no aumento de 400 vezes (Zeiss Axiovert S100). A) Células da LND foram cultivadas em placa recoberta com Matrigel® (1:20) com meio de cultivo com 10% de SOL; B) Células da linhagem digerida (LD) cultivadas em placa recoberta com Matrigel® (1:20) com meio de cultivo com 10% de SOL;C) Células da LND foram cultivadas com meio de cultivo com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), presença de	

estrutura semelhante a mamosfera e D) Células da LD cultivadas com meio de cultivo com 10% SFB - São Paulo – 2010.....	85
<p>Figura 8 - Imagens representativas de imunocitoquímica com marcação de DAPI (coloração azul que para núcleo celular) e anticorpo secundário com FITC (verde) para vimentina e citoqueratina (filamentos intermediários citoplasmáticos). A) Células da linhagem não digerida (LND) na passagem 12, células maiores e arredondadas marcadas positivamente para citoqueratina; B) Células da LND na passagem 12, marcação de todas as células com DAPI; C) Células da LND na passagem 12, células marcadas positivamente para presença de vimentina; D) Células da LND na passagem 12, marcação de todas as células com DAPI; E) Células da linhagem digerida (LD) na passagem 12, células marcadas positivamente para presença de citoqueratina; F) Células da LD na passagem 12, marcação de todas as células com DAPI; G) controle negativo da LND e H) controle negativo para LD - São Paulo – 2010.....</p>	86
<p>Figura 9 - Imagem representativa de gel de agarose 1% com brometo de etídeo através de transluminador com luz ultra-violeta A) 10µl plasmídeo ALAC após digestão com BamH1 e B) 10µl Plasmídeo BGL após digestão com Xho1 - São Paulo – 2010.....</p>	93
<p>Figura 10 - Infusão intra-mamária retrógrada com auxílio de sonda intra-mamária bovina e seringa estéril de 60ml; B) Glândula mamária esquerda com o volume aumentado após a infusão; C) Eletroporação da glândula mamária esquerda e D) Glândula mamária após eletroporação - São Paulo – 2010.....</p>	94
<p>Figura 11 - Imagem representativa do gel de policrilamida 15% sobre transluminador. Em cada amostra foram utilizados 10µl do produto do RT-PCR. A) β-lactoblobulina (100pb); B) α-caseína (301pb); C) β-caseína (106pb); D) κ-caseína (249pb); E) GAPDH (76pb) - São Paulo – 2010....</p>	127
<p>Figura 12 - Imagem representativa de Western-Blotting com diferentes diluições de Eritromax® (EPOrh) em filme de raio-x. 1) 20µl; 2) 10 µl; 3) 5µl; 4)</p>	

2,5µl; 5) 1,25µl e 6) 0,75µl. A) Diluições de Eritromax® em tampão da amostra; B) Diluições em leite de ovelha normal - São Paulo – 2010..... 136

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Evolução dos gastos do Governo Brasileiro com EPO entre 1995 e 2001.Fonte: Secretaria de Atenção a Saúde/Ministério da Saúde.....	40
Gráfico 2 - Número total médio de células das linhagens LND e LD com os tratamentos com meio adicionado com SOL ou SFB - São Paulo – 2010.....	87
Gráfico 3 - Média da velocidade de crescimento celular (célula/hora) com erro padrão para as linhagens LD e LND com o meio de cultivo acrescido com SOL ou SFB (P<0,05) – São Paulo – 2010.....	88
Gráfico 4 - Imagem representativa da expressão dos genes GAPDH, β -actina, β -caseína, α -caseína, κ -caseína e β -lactoglobulina nas LND e LD cultivadas com meio acrescido de SFB. Curva de expressão (A) e curva de dissociação (B) - São Paulo – 2010.....	91
Gráfico 5 - Curva da expressão (A) e de dissociação (B) para os genes β -lactoglobulina, α -caseína, β -caseína, κ -caseína, GAPDH. Em cada reação foi utilizado 800mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 μ g de cDNA de glândula mamária de ovelha lactante - São Paulo – 2010.....	126
Gráfico 6 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da α -caseína - São Paulo – 2010.....	129
Gráfico 7 - Curvas de eficiência (A), de dissociação (B) para o gene da β -caseína - São Paulo – 2010.....	130
Gráfico 8 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da κ -caseína - São Paulo – 2010.....	131
Gráfico 9 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da β -lactoglobulina - São Paulo – 2010.....	132

Gráfico 10 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da GAPDH - São Paulo – 2010.....	133
Gráfico 11 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da β -actina - São Paulo – 2010.....	134

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Ano de produção e preço aproximado de venda de biofármacos (LADISCH et al., 2001).....	39
Quadro 2 - Expressão da EPOrh no leite de animais transgênicos e não transgênicos (Adaptado de CASTRO et al., 2010)	57
Quadro 3 - Quadro 3: Sumário de algumas proteínas produzidas no leite e seus status em teste clínicos avançados ou finalizados (Adaptado de CASTRO et al., 2010).....	58
Quadro 4 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para RT-PCR tempo real - São Paulo – 2010	68
Quadro 5 - Número total de células obtidas com o tratamento das linhagens LD e LND cultivadas na P12 com os tratamentos com ou sem Matrigel e adição de SOL ou SFB no meio de cultivo - São Paulo – 2010.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Média com erro padrão e mediana com quartis da velocidade de crescimento celular para as linhagens LD e LND com o meio de cultivo acrescido com SOL ou SFB – São Paulo – 2010.....	88
Tabela 2 -	Média com erro padrão e mediana com quartis da velocidade de crescimento celular com o meio de cultivo acrescido com SOL ou SFB para as linhagens LD e LND - São Paulo – 2010	89
Tabela 3 -	Eficiência da expressão dos genes analisados e média da razão da expressão com erro padrão - São Paulo – 2010	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
AKT1	<i>AKT1 (V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALAC	Plasmídeo com região promotora da alfa-lactoalbumina
BGL	Plasmídeo com região promotora da beta-lactoglobulina
BHK	<i>Baby Hamster Kidney Cells</i>
BSA	Albumina sérica Bovina
CAR	Receptor Cocksackie
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary Cells</i>
ct	<i>Cycle Treshold</i>
DAPI	4', 6 diamidino-2-fenilindola
DL	<i>Digested ovine mammary cell line</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	<i>Epidermal Growth factor</i>
EMEA	<i>European Medicine Agency</i>
EPO	Eritropoietina
EPOh	Eritropoietina humana
EPOr	Ertropoietina Recombinante
EPOrh	Eritropoietina Recombinante Humana
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isoticianato de Fluresceína
g	Grama
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GH	<i>Growth Hormone</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Hora
IGF-I	<i>Insuline like Growth Factor – I</i>
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
Kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
I	Litro
LD	Linhagem Digerida
LND	Linhagem Não Digerida
LOS	<i>Lactating ovine serum</i>
MAb	Antocorpo Monoclonal
MEC	Matrix Extracelular
mA	Miliamper
mg	Miligrama
MGF	<i>Mechano Growth Factor</i>
min	Minuto
ml	Mililitro
ms	Milisegundo
NA	Não Analisado
ND	Sem Dados
NDL	<i>Non digested ovine mammary cell line</i>
ng	Nanograma
P3	Passagem 3
P4	Passagem 4
P8	Passagem 8
P10	Passagem 10
P12	Passagem 12
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pg	Picograma
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia-Transcriptase Reversa
s	Segundo
SFB	Soro Fetal Bovino
SOL	Soro de Ovelha Lactante
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription Protein</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator de Crescimento
	Transformante α
U	Unidade Internacional

USA

Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
κ	Kappa
$>$	Maior que
$+$	Mais
$\pm$	Mais ou menos
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$<$	Menor que
$-$	Menos
μ	Micro
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	34
2.1 PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS, BIORREACTORES E ERITROPOIETINA.....	34
2.1.1 Biofármacos	34
2.1.2 Eritropoietina	35
2.1.3 Eritropoietina recombinante	37
2.1.4 O mercado da eritropoietina.....	39
2.2 CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS E BIOENGENHARIA.....	40
2.2.1 Diferenças biológicas entre tipos celulares e consequências para bioengenharias	41
2.2.2 Vantagens do cultivo de células animais.....	42
2.2.3 Cultivo de células de glândula mamária.....	43
2.2.4 Cultivo de células de glândula mamária de ruminantes	45
2.2.5 Fatores relacionados com a regulação da expressão gênica e protéica das células da glândula mamária em ruminantes.....	48
2.2.6 Aplicações de cultura de células de glândula mamária de animais de produção.....	51
2.3 PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS NO LEITE DE OVINOS E BIOENGENHARIA.....	52
2.3.1 Mamogênese em ovinos	52
2.3.2 Produção e composição do leite ovino.....	54
2.3.3 Uso de animais para produção de eritropoietina no leite	55
2.3.4 O uso de pequenos ruminantes não transgênicos como biorreatores para a produção de biofármacos no leite.....	58
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS	61
3.1 HIPÓTESES.....	61
3.2 OBJETIVOS	61
4 MATERIAL E MÉTODO	64
4.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	64

4.1.1 Obtenção da biópsia de parênquima mamário e estabelecimento da cultura celular primária.....	64
4.1.2 Estabelecimento das passagens celulares	66
4.1.3 Cultivo das linhagens na passagem 12 com diferentes meios e Matrigel.....	67
4.1.3 Reações de polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real).....	68
4.1.4 Imunocitoquímica	71
4.1.5 Curva de crescimento	72
4.2 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> :.....	72
4.2.1 Indução de ovulação, inseminação e diagnóstico de gestação dos animais	73
4.2.2 Seleção e clonagem dos plasmídeos.....	73
4.2.3 Injeção plasmideal via intramamária retrógrada seguida de eletroporação.....	75
4.2.4 Coleta e armazenamento das amostras de leite	76
4.2.5 Processamento das amostras de leite	76
4.2.6 Western-blotting para a detecção da EPOrh no leite	77
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
5 RESULTADOS.....	81
5.1 EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	81
5.1.1 Estabelecimento, manutenção e caracterização morfológica das linhagens celulares	81
5.1.2 Cultivo das linhagens na passagem 12 com diferentes meios e Matrigel.....	84
5.1.3 Caracterização morfológica por imunocitoquímica dos filamentos intermediários (vimentina e citoqueratina)	85
5.1.4 Curva de crescimento	87
5.1.5 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real	89
5.2 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	92
6 DISCUSSÃO	96
7 CONCLUSÃO	103

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICES	124
ANEXOS.....	137

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A produção de biofármacos protéicos, como a eritropoietina recombinante humana (EPOrh), é essencial para a instituição de terapias para diversas enfermidades. Essa proteína é um fator hematopoiético produzido pelo rim, sendo a sua forma recombinante muito utilizada para o tratamento de anemias relacionadas à insuficiência renal crônica (MELLADO, 2005). A produção de algumas dessas proteínas por microorganismos geneticamente modificados, como bactérias, foi estabelecida como um sistema barato e inócuo (PALOMARES; ESTRADA-MONDACA; RAMIREZ, 2004). No entanto, muitos biofármacos produzidos por esse sistema apresentam atividade biológica inadequada pelo processo pós-traducional falho (SIMMONS; YANSURA, 1996). Já os sistemas biológicos ou biorreatores, baseados em células eucarióticas apresentam produção de proteínas recombinantes com especificidade e ação biológica adequada (WERNER et al., 1998). As células mais utilizadas em biorreatores são BHK (“Baby Hamster Kidney”), CHO (“Chinese Hamster Ovary”), Vero e hibridomas (KELLEY et al., 1993). Os biorreatores *in vitro*, formados com células de glândula mamária também são utilizados para produção estratégica e viável de proteínas recombinantes biologicamente ativas (ANDERSEN, 2002).

Além da produção de proteínas recombinantes em culturas de células, estão sendo desenvolvidos animais geneticamente modificados, ou biorreatores *in vivo*, capazes de produzirem proteínas recombinantes em seus tecidos e seus fluídos (WALL, 1996). A glândula mamária é um tecido alvo interessante para a produção de biofármacos que necessitam de modificações pós-traducionais para serem funcionais (CLARK, 1998). As proteínas sintetizadas na glândula mamária são imediatamente secretadas pelo leite, que é facilmente recuperado em grande volume e de onde podem ser purificadas por diversos processos como a cromatografia (POLLOCK et al., 1999). Dentre as diversas proteínas já expressas na glândula mamária de animais transgênicos se encontra a EPOrh. Ela já foi expressa com sucesso em glândula mamária de camundongos, coelhos e suínos, sendo que nos dois primeiros, os animais tiveram problemas relacionados à eficiência do promotor em dirigir a expressão para a glândula mamária e também problemas na

glicosilação protéica (RODRIGUEZ; ARNAUD; BLANCHET, 1995; MASSOUD et al., 1996; KORHONEN et al., 1997; UUSI-OUKARI et al., 1997; AGUIRRE; CASTRO-PALOMIND; DE LA FUENTE, 1998; MIKUS et al., 2001, 2004.; PARK, et al., 2006).

As construções genéticas como a inclusão de seqüências gênicas de interesse (seqüências regulatórias, por exemplo) são essenciais para a produção de biorreatores. Existem diversos promotores específicos que direcionam a expressão para o tecido alvo, sendo possível obter a expressão apenas na glândula mamária. As regiões promotoras das proteínas específicas do leite podem ser utilizadas para esse propósito, como a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina. Diversas técnicas já foram utilizadas para a produção de animais transgênicos capazes de secretar proteínas recombinantes no leite, (HAMMER et al., 1985; BALDASSORE et al., 2003).

Foi estipulado que para a produção de um animal transgênico capaz de produzir a proteína recombinante de interesse no leite sejam gastos aproximadamente entre 200.000 a 500.000 dólares (HOUEBINE, 2000; WHEELER, 2003), além do longo tempo necessário até a produção efetiva da proteína (RUDOLPH, 1999). A expressão ectópica no animal transgênico também é um grande problema, já que algumas proteínas recombinantes afetam a viabilidade e a qualidade de vida do animal transgênico quando expressas em outros tecidos (MASSOUD et al., 1996).

O uso de animais transgênicos para produzir proteínas recombinantes no leite, como a EPOrh, vem demonstrando que esta técnica apresenta alto custo para produção individual de cada animal. Os promotores não apresentam total eficiência no direcionamento da expressão gênica para o tecido alvo, podendo apresentar efeito negativo no metabolismo dos animais transgênicos. Como alternativa da transgenia, diversos grupos de pesquisa estão tentando desenvolver um sistema de expressão protéica em glândula mamária baseado na transferência de genes para o epitélio glandular *in situ*, sendo necessário o estudo de vários sistemas de produção como o complexo de poli-íons (HENZ et al., 2000), o receptor para mediação de endocitose (SOBOLEV et al., 1998), o injetor de genes (KERR et al., 1996), a eletroporação (DÜCHLER et al., 2002) e os vetores virais (ARCHER et al., 1994; YANG et al., 1995). Embora ocorra a produção da proteína de interesse ela ocorre em baixa quantidade, com alto custo e com resultados variáveis. O uso de técnicas para produção de proteínas recombinantes no leite de animais não-transgênicos

também pode ser empregada para teste de vetores que serão utilizados na produção de animais transgênicos, assim adiantando um resultado que só poderia ser obtido após longo período de trabalho com grandes gastos.

Vetores virais estão sendo utilizados para a transferência do DNA exógeno para o material genético das células alvos, obtendo sucesso graças à capacidade de infectar células quiescentes ou em multiplicação celular (SCHAGEN et al., 2004). Com o uso de adenovírus para transfectar a glândula mamária foi possível produzir EPOrh no leite de camundongas e de cabras sem comprometer a qualidade de vida dos animais pela presença da proteína exógena. No entanto, alguns trabalhos descrevem que a proteína recombinante apresenta falhas em sua atividade biológica pela pós-transdução falha, apesar da produção em alta concentração. Toledo et al. (2005) também descreveram a produção de EPOrh em altas concentrações no leite de cabras após a transdução da glândula mamária com vetor viral. No entanto, a EPOrh purificada do leite não estava glicosilada e apresentou baixa atividade biológica. Além da alteração pós-transducional, o uso de vetores virais necessita de maior cuidado para garantir sua inocuidade tanto ao meio ambiente quanto aos demais animais que estão em contato. Dessa forma, fez-se necessário o estudo de diversas outras formas de transfecção da glândula mamária.

Em 2000, Hens et al. verificaram a possibilidade da expressão do hormônio de crescimento humano (GH) no leite de cobaias após a transfecção da glândula mamária com o DNA de interesse complexado a uma mistura poli-iônica. Já Dühler et al. (2002) verificaram maior expressão de proteína recombinante quando utilizaram a infusão intra-mamária *in vivo* do gene de interesse acompanhada de eletroporação em ovelhas. A eletroporação *in vivo* ocorreu com a aplicação em duplicata de três pulsos elétricos de 500 Volts durante 15 ms cada. Não foi relatado nenhum tipo de alteração tecidual durante a eletroporação com até 1.000 Volts.

A tecnologia para a produção de proteínas recombinantes no leite de animais não-transgênicos possibilita a redução de custo e de tempo para produção de biofármacos no leite e o teste da capacidade de expressão de novas construções gênicas. No entanto, ainda não se estabeleceu um sistema no qual seja possível expressar a proteína recombinante biologicamente ativa em altas concentrações no leite. Assim, são necessários novos estudos com diferentes sistemas (*in vivo* e *in vitro*) e diferentes vetores para a expressão para a EPOrh ativa no leite, objetivando

validar um sistema para testar novas construções gênicas antes de produzir um animal transgênico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Descobertas relacionadas à utilização de células mamárias para a produção de proteínas recombinantes, como a EPO_{rh}, são estudadas a aproximadamente 30 anos. Na década de 1980 vários trabalhos estabeleceram novas linhagens celulares epiteliais mamárias, sendo duas de origem ovina. No entanto, ambas apresentaram apenas a produção uma proteína do leite. As células mamárias também foram utilizadas *in vivo* para a produção de proteínas recombinantes, sendo utilizados modelos tanto transgênicos quanto não transgênicos.

2.1 PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS, BIORREATORES E ERITROPOIETINA

Para a produção de EPO_{rh} são importantes aspectos relacionados a produção geral de biofármacos, da EPO e da sua forma recombinante e também o mercado econômico está envolvido com essa produção.

2.1.1 Biofármacos

Os maiores conhecimentos sobre DNA recombinante surgiram com a biotecnologia moderna, emergindo na década de 70 a desafiadora oportunidade de desenvolver novas proteínas terapêuticas, os biofármacos. No entanto, desde a descoberta da tecnologia até sua aplicação na indústria farmacêutica há um intervalo de quase 10 anos. Apenas em 1982 ocorreu a comercialização da insulina recombinante e em 1985 do GH (DAMM, 1998). Atualmente diversas proteínas recombinantes são produzidas e a comercialização autorizada pelas agências regulatórias.

A maioria das proteínas de uso terapêutico apresenta estruturas complexas e geralmente glicosiladas. As glicoproteínas apresentam cadeias de carboidratos na porção externa de sua membrana. A presença dessas cadeias, com localização periférica, influencia fortemente as propriedades físico-químicas e funcionalidade dos biofármacos. Como exemplo, se as cadeias de carboidratos fossem removidas de uma glicoproteína, sua massa molar seria reduzida em até 40%, tornando-se menos hidrofílica, menos solúvel e com maior formação de agregados insolúveis (MELLADO, 2005). Além disso, a estabilidade bioquímica seria afetada e estaria sujeita à ação de agentes proteolíticos (DAMM, 1998).

2.1.2 Eritropoietina

A eritropoietina (EPO) é um fator hematopoiético que regula e estimula a produção de hemácias. Ela é uma glicoproteína com aproximadamente 166 pares de bases (pb) e peso molecular entre 17 e 42 kDa. Dessa massa, mais de 40% está associado a sua porção formada por carboidratos (MELLADO, 2005). A presença desses carboidratos está relacionada com a funcionalidade, solubilidade, processamento celular e metabolismo *in vivo*. Como é possível observar na figura 1, a EPO humana tem 3 sítios de N-glicosilação (asparagina nas posições N24, N38 e N83) e uma O-glicosilação (serina na posição S126). A EPO apresenta estrutura globular caracterizada pela presença de 4 hélices alfa (A, B, C e D) e duas folhas β anti-paralelas (MELLADO, 2005).

Assim, como a maioria das glicoproteínas, a EPO apresenta diferentes isoformas relacionadas com diferentes cargas e porções de carboidratos presentes. Estudos demonstram que a variabilidade das isoformas está relacionada com ausência ou presença de resíduos siálicos com diferentes graus de acetilação. Esses fatores alteram as características eletroforéticas e o ponto isoelétrico das isoformas (GOKANA et al., 1997). As glicosilações da EPO estão demonstradas na figura 2.

Fonte: *Protein Data Bank*, 2003

Figura 1 - Estrutura tri-dimensional da eritropoietina humana

O primeiro emprego terapêutico da EPO_{rh} ocorreu em 1989 para o tratamento de anemia associada à insuficiência renal crônica. A EPO_{rh} também pode ser utilizada com outros propósitos terapêuticos como a anemia causada pela quimioterapia, redução de transfusão de sangue após cirurgias e prevenção de anemias após transplante de medula (WALSH et al., 1999).

Fonte: MELLADO, 2005

Figura 2 - Estrutura da cadeia glicídica da EPO

2.1.3 Eritropoietina recombinante

Broudy, Tait e Powell. (1988) foram os primeiros a identificar a EPO_{rh} em células de rim de filhote de hamster ("Baby Hamster Kidney cells-BHK) da linhagem 21.13 e não a obtida pelos processos de purificação da urina. A recuperação total da EPO_{rh} foi de 35% e atividade específica de 84.000U/mg. A proteína recombinante apresentou peso molecular de 34kDa, o que evidenciou que células de mamíferos tem a capacidade de realizar alterações pós-tradução como a glicosilação.

No entanto, a diferença entre a glicosilação da EPO obtida *in vitro* e *in vivo* foi responsável por alterar a meia vida plasmática nos ensaios biológicos. Os sacarídeos são essenciais no processamento intracelular e também medeiam as ligações com receptores específicos. Ainda, a ausência do ácido siálico terminal

reduz a atividade biológica da proteína, expondo os resíduos de sacarídeos aos receptores hepáticos responsáveis por remover moléculas da circulação (MELLADO, 2005).

A EPOrh também já foi expressa em células de inseto. Quelle et al. (1989) expressaram a proteína em células de *Spodoptera frugiperda*, sendo que a EPOrh apresentou, após purificação, atividade específica de 200U/mg. Foi detectada a presença de 3 isoformas (22kDa, 24kDa e 26KDa), utilizando meio de cultivo com menos de 4% de SFB (soro fetal bovino) e uma única isoforma (26kDa) quando a concentração de SFB foi superior a 4%. Foram realizados ensaios biológicos e as isoformas de 24 e 26 kDa apresentaram a mesma atividade. No entanto, verificou-se que essa atividade ocorria apenas em ensaio *in vitro*. A ausência de ácido siálico nos sacarídeos presentes nos insetos explica a não atividade protéica *in vivo*.

Com já visto, a EPO apresenta diferentes isoformas devido à ausência ou presença do ácido siálico que altera sua atividade biológica (MELLADO, 2005). A fim de identificar essas isoformas, Gokana et al. (1997) realizaram a purificação de EPO do caldo do cultivo de células linfoblastóides humanas. Foram isoladas 7 isoformas para a EPOrh com PI (ponto isoelétrico) divididos em ácido, intermediário e básico, obtendo-se recuperação de 65% após a purificação.

Lee, Huang e Lee (1999) desenvolveram um sistema para produção de EPOrh, utilizando as células de ovário de hamster chinês (CHO “Chinese Hamster Ovary”-) em suspensão com meio livre se soro. Eles obtiveram concentração de EPOrh de 17,9µg/ml. Embora essa concentração tenha sido considerada baixa, essa desvantagem foi praticamente anulada pela facilidade na purificação na ausência de soro no meio e pela atividade *in vitro* ser muito similar à atividade *in vivo*.

Já Chung et al. (2001) verificaram que a presença de butirato tem efeito negativo na produção de EPOrh em células CHO, pois as proteínas apresentaram oligossacarídeos com ausência de ácido siálico. Um ano depois, Burns et al. (2002) criaram uma EPOhr mutante que tinha como função o bloqueio da eritropoiese pela substituição de uma alanina por uma arginina na posição 103 (EPO R103A), impedindo o reconhecimento da molécula modificada pelo receptor específico para a EPOh.

2.1.4 O mercado da eritropoietina

Os custos relacionados com o processo para a produção comercial da EPOrh são elevados. No entanto, esse valor se torna baixo quando comparado ao valor de venda desse fármaco. O grande custo da EPOrh nas terapias está associado à ausência de concorrência no mercado para venda comercial e não à produção (MELLADO, M. C. M., 2005). Segundo Ladisch et al. (2001), a EPOr é o bioproduto de maior sucesso da história da biotecnologia. O valor aproximado por grama de diversos fármacos e anos de criação estão correlacionados no quadro 1.

Produto	Ano de aprovação	Preço aproximado de venda (US\$/g)	Quantidade de produto para US\$ 200 milhões (Kg)
Insulina humana	1982	375	530
Ativador plasminogênico tecidual	1987	23.000	8,7
Hormônio de crescimento humano	1985	35.000	5,7
Eritropoietina (Epogen)	1989	840.000	0,24
GM-CSF	1991	384.000	0,52
G-CSF	1991	450.000	0,44

Fonte: LADISCH et al., 2001

Quadro 1 - Ano de produção e preço aproximado de venda de biofármacos

O Epogen, EPOrh comercial, foi aprovado em 1989, sendo sintetizado pela Amgen (Thousand Oaks, Califórnia, EUA) em biorreatores baseados em células de mamíferos. Para não perder a patente das etapas de produção, essa empresa sempre lança produtos mais sofisticados como a EPO hiperglicosilada. Outra importante EPOrh comercial é o Eritromax (Blausigel, São Paulo, Brasil) que é composto pela EPO Omega e não pela alfa ou beta, como os demais produtos comerciais (MELLADO, M. C. M., 2005).

Além da Amgen, outras empresas comercializam a EPOrh no Japão, Argentina e Cuba. No Brasil a demanda de EPOrh gerou em 2001 um gasto de 88 milhões de reais para a Secretaria de Saúde. Entre os anos de 1995 e 2001, os gastos do Governo brasileiro com a importação desse fármaco aumentaram aproximadamente em 70 milhões de reais (Gráfico 1).

Fonte: Secretaria de Atenção a Saúde/Ministério da Saúde

Gráfico 1 - Evolução dos gastos do Governo Brasileiro com EPOrh entre 1995 e 2001.

No entanto, a comercialização da EPOrh facilitou o seu uso como agente de dopagem para atletas de alto rendimento, aumentando o desempenho anaeróbico. Em 1990 o Comitê Olímpico Internacional proibiu oficialmente seu uso em competições e laboratórios do mundo inteiro tiveram de estudar uma forma de diferenciar a EPO endógena da EPOrh.

2.2 CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS E BIOENGENHARIA

As células de organismos superiores (animais e vegetais) apresentam várias diferenças quando comparadas com células microbianas. Essas características são

essenciais para a o estabelecimento de biorreatores baseados em células eucarióticas.

2.2.1 Diferenças biológicas entre tipos celulares e conseqüências para bioengenharias

Enquanto as células de microrganismos estão adaptadas ao crescimento individualizado com a mesma morfologia, embora possam formar agregados, os diferentes tipos celulares de seres superiores apresentam função específica dentro do organismo, geralmente associada à morfologia específica. Durante a fase embrionária, essas células passam por diversas transformações, sendo que a célula adulta está diferenciada e é capaz de exercer a função em determinado tecido ou órgão. Essas células passam a sofrer interdependência, limitação não encontrada por células microbianas. Como exemplo se tem o consumo de carbono pelas células procarióticas. Elas são capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono e podem ser cultivadas em meios simples. No entanto, células de animais são fisiologicamente nutridas por fatores provenientes da corrente sanguínea, enquanto outras partes do organismo são responsáveis pela absorção de alimentos ingeridos e transformação em metabólitos responsáveis por nutrir as demais células do organismo (TONSO, 2000).

Dessa forma, pode-se concluir que para a o estabelecimento de cultivo de células eucarióticas *in vitro* (em biorreatores) emprega-se meio de cultivo extremamente complexo, contendo aminoácidos, vários sais minerais, ácidos graxos, vitaminas e glicose. Esses elementos têm a função de mimetizar os nutrientes fisiologicamente oferecidos pelo sangue (WOLFE, 1993). Esse meio é dividido em duas frações: nutrientes consumidos pelas células e componentes inorgânicos que promoverão a osmolaridade, força iônica e tamponamento adequados (GAMBHRIR et al.; 1999). Outra característica desse meio é a necessidade de duas fontes de carbono: a glicose e a glutamina (VRIEZEN et al.; 1997). No metabolismo dessas fontes de carbono basicamente a glicose é convertida em lactato e a glutamina em amônio (ZENG et al.; 1996).

Outra importante diferença entre as células animais e as microbianas é que as primeiras não apresentam membrana rígida, o que confere menor resistência ao estresse durante o cultivo (SAMBANIS et al., 1993) como a agitação de centenas de rotações por minuto, muito usada em biorreatores de células procarióticas. A agitação em cultivos de células animais geralmente é fator inibitório para o crescimento e várias alternativas são estudadas para a aeração desses sistemas de biorreatores como a aeração pela formação de bolhas (FENG et al., 1993; LAKHOTIA; BAUER; PAPOUTSAKI, 1993 e WU; GOOSEN, 1994).

Também existem várias diferenças entre os sistemas de biorreatores formados por células animais e por células microbianas. O primeiro tipo celular necessita passar por várias transformações para uso em processos industriais. Enquanto as células microbianas podem se reproduzir de forma ilimitada, as células retiradas de tecidos (primárias) podem ser sub-cultivadas por número finito de divisões, geralmente em torno de 50 (BUTLER, 1991). Após esse período, as células passam por processo de senescência e morte programada (apoptose). No entanto, algumas células podem perder essas limitações, originando linhagens imortais de as células transformadas e contínuas de forma espontânea ou pela carcinogênese. Os processos biotecnológicos como os biorreatores usam células transformadas, obtendo maior número de divisão celular possível. As linhagens celulares comuns usadas nesse processo são: BHK ("Baby Hamster Kidney"), CHO ("Chinese Hamster Ovary"), Vero e hibridomas (KELLEY et al., 1993).

Outra característica muito importante relacionada às células animais é a baixa velocidade específica de crescimento que varia entre 0,01 e 0,05/h. Esse fator é muito importante, pois é um dos principais responsáveis por encarecer o processo industrial (BAILEY; OLLIS, 1986; BUTLER, 1991).

2.2.2 Vantagens do cultivo de células animais

Em contrapartida às dificuldades do emprego de células animais em biorreatores (alta complexidade dos meios, fragilidade mecânica, baixa velocidade de crescimento e necessidade de desenvolvimento de linhagens contínuas), seu uso

permite a síntese de fatores que não seria possível por células procarióticas ou que teriam custo de produção comercialmente inviável (TONSO, 2000). Muitas proteínas, para exercer a sua função terapêutica, necessitam de alterações pós-traducionais como: glicosilação, fosforização, sialização, carboxilação, amidação, acetilação e sulfatação (MAINS et al., 1987). De todas as alterações, a mais importante é a glicosilação, sendo estudada a clonagem celular com a enzima glicosiltransferase (JENKINS, PAREKH; JAMES, 1996). Um exemplo clássico da importância da glicosilação para funcionalidade é o fator de coagulação VIII. Essa proteína é uma molécula grande (265kDa) e altamente glicosilada (HIRONAKA et al., 1993) cuja síntese por microrganismos nunca foi possível. No entanto, esse fármaco teve a produção industrial estabelecida a partir da expressão em biorreatores baseados em BHK-21 (CHAN; LEMBACH, 1994).

Além da produção de biofármacos protéicos, essa tecnologia pode ser utilizada para a produção de anticorpos monoclonais (MAb). O cultivo de hibridomas tornou possível a produção de MAbs em larga escala para estabelecimento de sistemas de diagnósticos e outras aplicações terapêuticas (BLANCH; CLARK, 1997). Atualmente, os hibridomas são capazes de secretar até 100pg de anticorpo por célula por dia, atingindo 1E6 células/ml (BIBLIA; ROBINSON, 1995).

2.2.3 Cultivo de células de glândula mamária

Aproximadamente 80% dos cânceres de adultos humanos são carcinomas originados por transformação maligna de células epiteliais (BAND, 1995), sendo o câncer de mama a segunda maior causa de morte entre as mulheres. Assim, o desenvolvimento de modelos *in vitro* é essencial para o estabelecimento de novas terapias (BAND, 1995), sendo que vários estágios de desenvolvimento das células epiteliais mamárias podem ser mimetizados *in vitro*. A necessidade do desenvolvimento de novos modelos também é enfatizada pelo fato que muitos conhecimentos gerados em estudos *in vitro*, são baseados em culturas de fibroblastos (DIMRI; BAND BAND, 2005).

Quando as células mamárias são cultivadas sobre colágeno, o epitélio assume forma tridimensional, sendo observada a formação de ductos com ramificações (EMERMAN; JOGL, 1977; GUZMAN et al., 1982; YANG et al., 1897). Já o tratamento com hormônios lactogênicos induz a expressão protéica no leite (GUYETE, MATUSIK; OSEN, 1979; GANGULY et al., 1980; CHOMCYNSKI; QASBA; TOPPER, 1984). O fator de glândula mamária (MGF-“mammary growth factor” também conhecido como STAT5) é considerado um dos principais mediadores na resposta de hormônio lactogênicos e da prolactina (PRL) (WAKAO; GOUILLEUX; GRONER, 1994).

O desenvolvimento de animais modificados por engenharia genética para o estudo de câncer e seus tratamentos é um processo longo, demorado, caro e geralmente complexo (JECHLIGER et al., 2010). Assim, o desenvolvimento de culturas celulares mamárias é utilizado como alternativa aos animais transgênicos para estudo de correlação entre as células. Atualmente diversas linhagens de células de glândula mamária já foram estabelecidas para camundongos (LEE et al., 1985; HURLEY et al., 1994; SMALLEY et al., 1999 e JECHLINGER et al., 2009). O parênquima mamário dos animais de laboratório é formado por dois tipos celulares principais: epiteliais luminais e mioepiteliais basais. O primeiro tipo se apresenta no tecido com estrutura cubóide ou colunar baixa que formam os alvéolos e os ductos, sendo responsável pela secreção do leite. A maioria dos ductos apresenta apenas uma monocamada celular (SEKHRI; PITELKA; DEOME, 1967). Já as células mioepiteliais se posicionam em monocamada e estão orientadas em paralelo ao redor do ducto formado pelas células epiteliais luminais. No alvéolo, as células mioepiteliais apresentam-se como estruturas semelhantes a “cestas de basquete” (EMERMAN; VOGL, 1986) (Figura 3).

Por muitos anos a única linhagem celular mamária funcional e bem estabelecida foi a COMMA-1D (DANNIELSON; OBORN; DURBAN, 1984; MEDINA; SMITH, 1990), originária de fêmea prenhe de camundongo normal. Quando transplantadas, essas células têm a capacidade de gerar tecido mamário normal: ductos, brotos e alvéolos. No entanto, após o transplante de células provenientes de passagens superiores a décima foi observada a presença de hiperplasia alveolar e tumores mamários (MEDINA; SMITH, 1990). Clones dessa linhagem celular foram extensivamente utilizados em estudos para analisar os efeitos do hormônio lactogênio e da presença de MEC (matriz extracelular) na produção de genes

correlacionados com proteínas do leite (ROSKELEY; BISSEL, 1995), demonstrando a importância da diferenciação na funcionalidade celular (GORDON et al., 2000). Em todos esses trabalhos foi relatada a presença de estruturas semelhantes a alvéolos e não de brotos ou ductos, quando a diferenciação foi realizada com MEC.

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2006

Figura 3 - Células secretórias da glândula mamária com proteínas e lipídios sendo liberados por exocitose. Presença de células mioepiteliais na porção basal das células secretórias

Além das linhagens de células epiteliais mamárias para animais de laboratório, já foram estabelecidas algumas linhagens para os animais domésticos como bovinos (MATITASHVILI; BAUMAN, 1999, LAMMERS et al., 1999; ROSE et al., 2002; WELLNITZ; KERR, 2004; HU et al., 2009), suínos (SUN; LI; CHOU, 2006) e ovinos (DÜCHLER et al.; 1998 e ILAN, et al., 1998).

2.2.4 Cultivo de células de glândula mamária de ruminantes

O desenvolvimento de cultura de célula epitelial mamária é uma importante ferramenta para estudos de relevância fisiológica em que o comportamento celular é

crucial. Em comparação aos estudos *in vitro* com mamogênese e lactação em roedores, o número de estudos com ruminantes é ainda muito modesto. É importante salientar que o uso desses modelos experimentais baseados em células de roedores para estudo da lactação em ruminantes tem uma aplicação limitada pelas muitas diferenças biológicas da lactação entre roedores, humanos e ruminantes (WHEELER et al., 1995). As principais diferenças são a composição do leite (e a resposta das células epiteliais mamárias aos fatores modeladores JENNESS; SLOAN, 1974; GREEN; PASTEWKA, 1976). Sendo importante lembrar que a manutenção da cultura de células mamárias epiteliais em estado diferenciado é essencial para estudos de regulação e de síntese de componentes do leite (MATITASHVILI; BAUMAN, 1999).

Existem diversos estudos relacionados com o desenvolvimento de culturas primárias de células mamárias provenientes de ratos, camundongos e humanos, sendo descritos alguns relatos de imortalização celular. Esse processo pode ser estabelecido por diferentes vias como os tratamentos com drogas mutagênicas (KITTRELL; OBORN; MEDINA, 1992), a transformação por inserção gênica mediada por vírus (BAND, 1995; FOSTER; GALLOWAY, 1996), a origem de tecidos de câncer de mama (FERNIG et al., 1993) ou a imortalização espontânea (SHAY et al., 1995). Embora o isolamento de células epiteliais mamárias seja um processo relativamente simples (BARCELLOS-HOFF et al., 1989; ETHIER et al., 1993; DARCY et al., 2001), o seu cultivo por um longo período é um processo trabalhoso já que a expectativa de vida no tecido é baixa (DÜNCHLER et al., 1998).

Os primeiros estudos relacionados com cultivo de célula mamária em bovinos trabalhavam com cultura de explantes mamários. A secreção de proteínas do leite, em culturas estabelecidas a partir de ácinos isolados de glândula mamária bovina, foi observada por mais de 6 dias (WINDER; TURJEY; FORSYTH, 1988; TALHOUK; NEISWANDER; SCHNBACHER, 1990). No entanto, nesses estudos não foi estabelecida nenhuma correlação com hormônios lactogênicos e galactopoiéticos. Outros dois estudos com cultura de ácinos mamários bovinos (ANDERSEN; LARSEN, 1970; GERTLER. et al., 1981) relataram a ocorrência de queda na expressão de proteínas do leite entre os dias 1 e 2 de cultivo, ocorrendo redução dessa queda na presença de hormônios galactopoiéticos. Wheeler, Callaghan e Davis (1995) observaram que a síntese de α -caseína, β -caseína e a secreção de β -lactoglobulina se mantiveram altas até 8h de cultivo. Aproximadamente 25% da queda da síntese e

secreção ocorreram entre 8-24h de cultivo. Os autores não observaram nenhum efeito do SFB e dos hormônios lactogênicos/galactogênicos, presentes no meio de cultivo, no perfil da queda. No entanto, a adição de SFB aumentou em quatro vezes a marcação extracelular para α -caseína.

Em 1991, foi estabelecida uma linhagem bovina de células mamárias epiteliais (MAC-T) que apresentou algumas semelhanças com a função mamária *in vitro*, já estudada com culturas de ácinos (HUYNH; ROBITAILLE; TURNER, 1991). No entanto, o desempenho dessa linhagem foi pouco estudado quanto comparado com os estudos realizados com a glândula *in vivo*. Nas últimas décadas foram estabelecidas diferentes linhagens de células mamárias bovinas (MATITASHVILI; BAUMAN, 1999; LAMMERS et al., 1999; ROSE et al., 2002; WELLNITZ; KERR, 2004 e HU et al., 2009). Nessas linhagens foram relatadas expressão protéica de β -caseína (MATITASHVILI; BAUMAN, 1999 e HU et al., 2009) e α -caseína (ROSE et al., 2002). Entre as linhagens de células mamárias bovinas mais antigas estão a HH2A e a BMEC+H com ausência de expressão de caseína ou a BMEUV com baixa expressão, que é regulada pela presença de colágeno (ZAVIZION et al., 1996).

Em 1998, dois trabalhos relataram o estabelecimento de duas novas linhagens imortalizadas de células epiteliais ovinas, a OMECII (DÜCHLER et al., 1988) e a NISH (ILAN et al., 1998). A primeira linhagem a ser estabelecida foi a OMEC II, sendo utilizadas biópsias de glândula mamária de animais provenientes de abatedouro em diferentes idades. Os fragmentos foram digeridos com collagenase e cultivados por mais de 70 passagens com meio suplementado com SFB, insulina e antibióticos. Foi realizada a imunocitoquímica com anticorpos primários policlonais anti-vimentina e anti-citoqueratina, ocorrendo também a diferenciação celular em placas de cultivo recobertas com colágeno. A vimentina é um marcador para células de origem mesodérmica, já a citoqueratina para células epiteliais ou mesoteliais (FRESHNEY, 1994). Nesse procedimento, os anticorpos primários reconhecem e se ligam a proteína de interesse, no caso vimentina e citoqueratina. Os anticorpos secundários marcados com uma fluorescência reconhecem os sítios dos anticorpos primários e ligam-se a esses. A fluorescência pode ser ativada por diversos fatores como a luz ultra-violeta.

Durante a execução do projeto, o autor observou que as células poderiam se multiplicar em altas taxas, utilizando apenas meio de cultivo tradicional com 10% SFB, sem a adição de nenhum fator de crescimento ou hormônio. Como resultado

da imunocitoquímica, observou-se que as células eram positivas para a marcação com citoqueratina e negativas para vimentina. O cultivo em placas recobertas com colágeno possibilitou que as células assumissem conformação tridimensional. O tratamento com hormônios lactogênicos aumentou a frequência de “cúpulas” celulares, mas não afetou a expressão de β -lactoglobulina.

Já a segunda linhagem de células mamárias ovinas relatadas na literatura (NISH) foi desenvolvida a partir de biópsia de glândula mamária de ovelha da raça Booroola-Assaf no dia 80 da gestação (fase em que ocorre grande desenvolvimento e diferenciação do parênquima mamário). O fragmento foi digerido com collagenase e tripsina e cultivado em placas de Petri de 35mm, sendo o meio de cultivo suplementado com insulina e hidrocorticoide. Foi realizada a imunohistoquímica com anticorpos policlonais anti-vimentina, anti-citoqueratina e anti β -lactoglobulina. A diferenciação celular foi realizada em placas recobertas com MEC comercial (Matrigel®) ou colágeno.

Durante o experimento, o autor observou que nas passagens iniciais a taxa de replicação celular foi baixa, sendo a morfologia celular mantida até a vigésima passagem. Também foi observado que a adição de GH aumenta de forma consistente a expressão de β -lactoglobulina. A expressão dessa proteína também foi estimulada pela forma tridimensional que as colônias assumiam com a presença de colágeno ou Matrigel®. Nesse estudo, também foi realizada a transfecção da cultura com gene da albumina sérica humana com o uso de lipofectamina, sendo essa linhagem celular uma alternativa para o teste da eficiência de vetores que serão utilizados na transgenia animal.

2.2.5 Fatores relacionados com a regulação da expressão gênica e protéica das células da glândula mamária em ruminantes

Já é muito bem estabelecido que a presença de hormônios lactogênicos como insulina, hidrocortisona e hormônio esteróide (STAMPFER; HALLOWES; HACKETT, 1980) e a presença de colágeno ou MEC (HURLEY et al., 1994) alteram a expressão de proteínas do leite em culturas de células mamárias. As presenças

tanto da MEC quanto do colágeno propiciam às células suporte para assumirem formação tridimensional conhecida como mamosfera (HURLEY et al., 1994).

O desenvolvimento fisiológico *in vivo* da glândula mamária é dependente de muitos fatores como o estrógeno, a progesterona, a PRL, o GH, o lactogênio placentário, os hormônios tireoidianos, os glicocorticóides e a ocitocina (COWIE; FORSYTH; HART, 1980; FORSYTH; 1996, TUCKER, 2000 e NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002). Muitos estudos foram estabelecidos para conhecer as vias de sinalização dos diferentes fatores que afetam o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação de culturas de células mamárias de animais de laboratório e de humanos. No entanto, o conhecimento desses fatores e suas cascatas de reação ainda são pouco conhecidos para os ruminantes.

Já é bem conhecido, também para os ruminantes, que o estrógeno é fundamental para a proliferação de células epiteliais mamárias e para o desenvolvimento dos ductos. No entanto, o desenvolvimento lóbulo-alveolar durante a gestação é dependente de progesterona. Os efeitos desses hormônios esteróides estão relacionados com a presença de seus receptores intranucleares nas células mamárias (CONNOR et al., 2007). Estes autores também verificaram a menor frequência de receptor β para estrógeno e maior abundância de receptores para progesterona em células da glândula bovina, quando comparada às células de roedores. Especularam que as inter-relações entre as diferentes isoformas de receptores de estrógeno que regulam a expressão de receptores de progesterona podem estar relacionadas com as diferenças entre as espécies. Os autores também demonstraram a expressão de quantidades substanciais de receptores de estrógeno no tecido adiposo de glândula mamária de novilhas pré-púberes, junto com uma expressão coordenada de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF I - "Insuline-like Growth Factor I"). Assim esse tecido estimularia o crescimento do parênquima por mecanismo estrógeno responsivo parácrino. Com o avanço da tecnologia, os pesquisadores verificaram mais de 100 genes responsivos ao estrógeno, sendo importante lembrar que o estrógeno está correlacionado com proliferação de células epiteliais mamárias, aumento da renovação da MEC do parênquima mamário e aumento do depósito de MEC no tecido adiposo.

Rudolph et al. (2003) ao verificarem a expressão gênica de diversos genes, entre eles o relacionados com proteínas do leite na glândula mamária de camundongo, sugeriram um modelo para regulação da ativação e diferenciação de

células mamária pela progesterona. Os autores propuseram o mecanismo pelo qual a progesterona suprime a secreção de leite em prenhes tardia. A ativação do TGF- β , (*Transforming Growth Factor beta* – Fator de crescimento transformante beta), Wnt-5b (subgrupo de proteína de sinalização intracelular da família Wnt) e IGFBP-5 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5* – Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 5) bloqueiam as vias da IGF I e PRL. O declínio das concentrações de progesterona próximo ao parto permite que a IGF I e a PRL estimulem a secreção de leite pela ativação do fator AKT1 (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) e permite a síntese de lipídeos pela estimulação do SREBP1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1* – Proteína ligadora do elemento regulatório de esterol) e outros fatores gênicos para produção de lipídeos.

Assim, os meios de cultivo usados para diferenciação de células da glândula mamária apresentam muitos fatores já descritos como a hidrocortisona, os hormônios esteróides, o GH, a insulina e o IGF I. Jonhson et al. (2010) verificaram que a presença do GH no meio de cultivo de células mamárias bovinas da linhagem MAC-T aumenta a expressão do RNAm de caseína e lactoalbumina. Esse hormônio também foi correlacionado, em outro trabalho, com o aumento da expressão do RNAm de α e β -caseína e α -lactoalbumina (ZHOU; AKERS; JJANG, 2008). Geralmente o cultivo de células MAC-T é realizado com dexametasona, insulina e PRL (HUYNH; ROBITAILLE; TUNNER, 1991 e MATITASHVILI; BRAMLEY; ZAVISION, 1997). Forsyth, Taylor e Moorby et al. (1998) verificaram que a presença de Fator de Crescimento Epidermal (Epidermal Growth Factor - EGF) e Fator de Crescimento Transformante α (Transforming Growth Factor alfa- TGF α) na presença de heparina, no meio de cultivo células mamárias ovinas, estimulou a síntese de DNA por essas células. Segundo Forsyth et al. (1997) o EGF é produzido na glândula mamária ovina normal. Também já foi demonstrado que a síntese de DNA dessas células é aumentada pela presença de IGF I (WINDER; TURVEY; FORSYTH, 1989).

Nos trabalhos em que se isolaram linhagens de células imortais da glândula mamária ovinas (ILAN et al., 1998 e DÜNCHLER et al., 1998), houve aumento das concentrações de proteínas do leite quando foram submetidas à diferenciação. No primeiro trabalho, a diferenciação foi realizada com meio de cultivo adicionado de GH e placas de cultivo recobertas com colágeno ou MEC comercial. Já no segundo

trabalho, a diferenciação foi realizada com meio de cultivo adicionado de insulina, PRL e hidrocortisona.

Matitashvili e Bauman (1999) verificaram a expressão de RNA em abundância para os genes α -caseína, β -caseína, κ -caseína e α -lactoalbumina em cultivo de células mamárias bovinas. Essa expressão foi máxima com a diferenciação celular com a presença de MEC para os quatro primeiros genes, sendo superior ao grupo em que a diferenciação foi realizada com colágeno ou colágeno mais Matrigel®. Assim, a diferenciação das células mamárias de ruminantes pode ser realizada pela adição de fatores no meio de cultivo ou pelo cultivo das células em superfícies recobertas por MEC ou colágeno.

2.2.6 Aplicações de cultura de células de glândula mamária de animais de produção.

A glândula mamária é um ótimo modelo para se estudar a proliferação, diferenciação celular, organogênese e a oncogênese (ILAN et al., 1998), sendo que a cultura de células epiteliais mamárias assume papel muito importante para esses estudos. O desenvolvimento de linhagens imortais é muito importante, pois suas células não sofrem senescência e não alteram sua funcionalidade ao longo das passagens (ROSE et al., 2002). Atualmente existem diferentes linhagens celulares imortais para bovinos (GIBSON et al., 1991; HUYNH; ROBITAILLE; TURNER, 1991; GERMAN; BARASH, 2002; ROSE et al., 2002; ZHAO et al., 2010), ovinos (DÜCHLER et al., 1998 e ILAN et al., 1998), caprinos (PANTSCHENKO et al., 2000) e suínos (SUN; LI, CHOU, 2006).

Segundo Sun, Li e Chou (2006), o estabelecimento de cultivos de glândula mamária é um ótimo modelo para seleção de animais transgênicos que tenha modificação gênica direcionada à glândula. Outro uso possível para a cultura é o teste de vetores que serão utilizados para produção desses animais. Wu, Lin e Huang. (2003) verificaram a ocorrência da expressão da proteína fluorescente verde em células epiteliais mamárias de camundongo, utilizando como promotor para o vetor o gene da β -caseína caprina.

Uma nova utilização foi proposta por Lammers et al. (1999) em que o cultivo de célula de glândula mamária bovina foi usado para avaliar o tropismo celular do *Staphylococcus aureus* pelas células em cultivo. Assim, foi estabelecido um modelo *in vitro* para as mastites causadas por esse agente patogênico. Outro importante uso é como células doadoras de núcleo para a clonagem animal por transferência nuclear. Wilmut et al. (2007) verificaram a possibilidade de obter produto viável após o procedimento, sendo a taxa de eficiência superior quando comparada àquela em que foram utilizados fibroblastos com células doadoras de núcleo.

2.3 PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS NO LEITE DE OVINOS E BIOENGENHARIA

Para a produção de proteínas recombinantes no leite ovino é fundamental primeiramente estabelecer alguns conceitos relacionados com mamogênese, proteínas expressas no leite e os fatores envolvidos na sua regulação da expressão tanto *in vivo* e quanto *in vitro*. Atualmente já foram estabelecidos diversos modelos animais como ratos, coelhos, cabras e ovelhas que secretavam proteínas recombinantes em seu leite.

2.3.1 Mamogênese em ovinos

O parênquima mamário é constituído pelos alvéolos secretórios e os ductos, ambos formados por células de origem epitelial. Em borregas, o desenvolvimento do parênquima mamário é caracterizado pela proliferação de células indiferenciadas, sendo o desenvolvimento dos ductos restrito pela presença de tecido adiposo circundante. Apenas durante a gestação, essas células indiferenciadas se proliferam e diferenciam para ductos e nas células especializadas na secreção do leite presente nos alvéolos (SILVA, 2009). O estroma que encapsula o parênquima mamário é composto por tecido adiposo que também apresenta a função de suporte

de todas as estruturas. Além do tecido adiposo, está presente no estroma um sistema linfático e vascular, nervos e células mioepiteliais (TOLMAN; MCKUSICK, 2001).

O desenvolvimento da glândula mamária em ruminantes ocorre em estágios específicos como ao nascimento; a partir do segundo mês de vida; após a puberdade e gestação. Ao nascimento a glândula mamária é formada por ductos simples que se direcionam para o teto. Em borregas de 1-2 meses há crescimento isométrico do tecido epitelial com relação ao desenvolvimento corporal. Nessa fase ocorre o crescimento de ductos secundários e terciários na zona periférica a cisterna glandular (SILVA, 2009). Também ocorre o crescimento de tecido adiposo e de tecido não epitelial conectivo (SEJRJEN; PURUP, 1997), formando uma massa densa que se expande, substituindo o tecido adiposo (HOVEY; MCFADDEN; AKERS, 1999). Durante essa fase, o tecido adiposo e a estrutura conectiva de sustentação também estão em multiplicação (SEJRSEN et al., 2000).

Após a puberdade, o tecido mamário retoma o seu crescimento isométrico, sendo que o próximo crescimento, agora alométrico, apenas ocorre com a gestação (SEJRSEN et al., 2000). O crescimento do tecido mamário, pela multiplicação dos ductos ocorre, de forma mais intensa, no início da gestação dos ovinos. Sendo no período final da gestação que há a diferenciação do tecido epitelial, formando os alvéolos ancorados por colágeno (SILVA, 2009). Anderson (1975) demonstraram por quantificação de DNA que 20% do crescimento mamário ocorre do nascimento à puberdade, 78% durante a gestação e 2% durante a lactação.

Sabe-se que a produção de leite está relacionada com a quantidade de células epiteliais (HOVEY; MCFADDEN, AKERS, 1999). Entre o parto e o pico de lactação, as células secretórias hipertrofiam e completam a sua diferenciação. Em vacas leiteiras, após o pico de lactação a atividade celular é mantida, mas há uma queda no número de células alveolares e conseqüentemente queda na produção de leite (FORSYTH, 1996).

2.3.2 Produção e composição do leite ovino

O número de ovelhas ordenhadas em todo o mundo atualmente é de 250 milhões, sendo ao menos uma ordenhada em cinco ovelhas existentes (CAJA et al., 1993). Muitos fatores estão relacionados tanto com a quantidade quanto a qualidade do leite produzido como: ambiente, raça, idade da ovelha, estágio de lactação, número de cordeiros, técnica de ordenha, estado sanitário, manejo do rebanho e nutrição (PEETERS; BUYS; ROBIJNS, 1992; BENCINI; PULINA, 1997). O volume de leite produzido também se relaciona positivamente com o número de crias, sendo que fêmeas de primeira cria têm a menor produção. O máximo da produção ocorre na terceira ou quarta lactação e, após há tendência a queda (BENCINI e PULINA et al., 1997). Cardellino e Benson (2002) verificaram aumento na produção anual de 9% entre ovelhas que pariram no primeiro ano de vida versus ovelhas que pariram no segundo ano. No entanto em 1995, Hassan não verificou nenhuma correlação entre produção e idade, havendo apenas tendência de ovelhas mais velhas (entre 3 ou 4 anos) em maior produção e persistência da lactação.

Outro fator importante é a fase da lactação em que se encontra a fêmea. O pico de lactação tem início e duração muito variável, conforme mostra a literatura: entre terceira e quinta semana de lactação (BENCINI; PULINA, 1997), na primeira semana (BOUJENANE e LAIRINI, 1992) e sétima semana após o parto (HASSAN., 1995). Essa variação se deve em grande parte às diferentes raças utilizadas nos vários trabalhos. Depois do pico da lactação, o declínio da produção ocorre em função dos genótipos e dos potenciais individuais para a produção de leite (BENCINI; PULINA, 1997). Uma variável que deve ser considerada é a diminuição da sucção durante as mamadas dos cordeiros, isto se deve tanto pelo aumento do consumo de matéria seca quanto ao comportamento materno em restringir o número de mamadas (PEETERS; BUYS; ROBIJNS, 1992). Estudos demonstram que ocorre alteração da composição do leite entre as ordenhas de ovelhas ordenhadas duas vezes ao dia (manhã e tarde) com intervalo de 10h. A ordenha da manhã apresentou maior volume, mas com menor concentração de proteínas e lipídios (PEETERS; BUYS; ROBIJNS, 1992 e FUENTE et al., 1997). Já no trabalho realizado por Simos, Nikolaous e Zoiopoulos (1996) não houve diferença entre concentração protéica e

lactose entre os mesmos dois grupos. Ocorreu diferença apenas nas taxas de gordura que foram superiores no grupo ordenhado pela tarde.

Existe uma correlação inversa entre volume de leite produzido e concentração de seus elementos constituintes. Essa relação se mantém independentemente de raças que tenham maior ou menor produção, entre animais do mesmo rebanho ou entre os diferentes estágios da lactação (BENCINI; PULINA.,1997). No estudo realizado por Hassan (1995), os autores verificaram que ao longo da lactação ocorreu queda no volume de leite, mas um aumento na concentração de sólidos totais. É importante salientar que a presença de células somáticas altera a composição do leite. O número de células somáticas aumenta consideravelmente com a existência de processos inflamatórios e patológicos na glândula mamária, reduzindo as taxas de gordura, caseína e sólidos totais (BENCINI; PULINA, 1997).

2.3.3 Uso de animais para produção de eritropoietina no leite

Muitos laboratórios e grupos de pesquisa têm trabalhado com a expressão de proteínas recombinantes no leite, sendo a espécie escolhida para a produção do fator recombinante uma união entre vários fatores. O primeiro fator a ser analisado é a quantidade da proteína a ser expressa. No entanto, nem todos os genes produzem os resultados esperados em uma espécie, mesmo com todos os cálculos corretos e com metodologia com eficiência comprovada para produção de proteínas recombinantes no leite. Outro fator que altera a escolha da espécie é a atividade biológica da proteína expressa e seu possível efeito na corrente sanguínea do animal hospedeiro. Além disso, a atividade biológica da proteína recombinante está intimamente relacionada com o perfil de glicosilação (CASTRO et al., 2010).

Para a criação da unidade de produção realmente viável de determinada proteína recombinante, as características bioquímicas e biológicas são cruciais, sendo bom exemplo a EPOrh. As tentativas para a expressão de EPOrh no leite de animais transgênicos (ratos e coelhos) falharam em produzir uma proteína com pureza suficiente para condução dos estudos de glicosilação (DROHAN et al., 1994; SIMONS; WILMUT; CLARCK., 1998; JAE et al., 2009 e CASTRO et al., 2010). Outro

problema relacionado à produção de animais transgênicos para a expressão de EPOrh foi relatado por Sánchez et al. (2004). Foi possível verificar alterações durante a gestação, ocorrendo expressão ectópica da proteína recombinante em outros órgãos que não a glândula mamária. A expressão desregulada causada pelo promotor WAP pode ser observada em análise *in vivo* e por explantes de glândula mamária de coelhas transgênicas (HAMMER et al., 1985 e SCHNIEKE et al., 1997). A mesma problemática foi encontrada no desenvolvimento de outros animais transgênicos que propunham a expressão da EPOrh no leite de ratos e coelhos (AGUIRRE; CASTRO-PALOMIND; DE LA FUENTE; CASTRO-PALOMIN; 1998). No quadro 2 estão relacionados alguns os trabalhos de grande relevância que propuseram a expressão de EPOrh no leite de animais transgênicos e não transgênicos (JAE et al., 2009).

Os dados correlacionados no quadro 2 indicam que a glândula mamária é capaz de expressar recombinantes complexos, mas estudar o padrão de glicosilação não é uma tarefa óbvia. Ela é ainda mais complexa em espécies que apresentam longos intervalos reprodutivos como os ruminantes (CASTRO et al., 2010).

Da metade para o final da década de 90, vários grupos de pesquisadores concordavam que a glândula mamária não era capaz de sintetizar corretamente todos os tipos de proteínas (CASTRO et al., 2010). Muitas dessas conclusões basearam-se em estudos realizados com atividade biológica de EPOrh produzida no leite (DROHAN et al., 1994; SIMONS; WILMUT; CLARCK, 1998; e JAE et al., 2009) e também na sua glicosilação incompleta (AGUIRRE; CASTRO-PALOMIND; DE LA FUENTE , 1998). Foi sugerido que a glândula mamária tem capacidade limitada para a glicosilação protéica que é reduzida quando é superior a 1mg/ml (RODRÍGUEZ; ARNAUD; BLANCHT, 1995).

Espécie	Método	Nível de expressão Maximo no leite (ng/ml)	Atividade biológica	Autor
Coelhos	Microinjeção	0	NA	Jaeet al., 2009
Ratos	Microinjeção	10	NA	Drohan et al., 1994
Coelhos	Microinjeção	25	500.000U/mg (in vitro)	Drohan et al., 1994
Ratos	Microinjeção	44	NA	Jaeet al., 2009
Coelhos	Microinjeção	8	450.000U/mg (In vitro)	Bosch et al., 2004
Ratos	Microinjeção	50.000	ND	*
Coelhos	Microinjeção	800	ND	*
Coelhos	Microinjeção	50.000	ND	*
Cabras	Transdução adenoviral	2.000.000	Sim (in vitro)	Toledo et al., 2005

Fonte: Adaptado de Jae et al. (2009) e Castro et al. (2010).

NA = não analisado; ND = não disponível

Quadro 2 - Expressão da EPOrh no leite de animais transgênicos e não transgênicos (Adaptado de CASTRO et al., 2010)

A EPO foi por mais de 20 anos a droga com maior sucesso de venda mundial até que foram substituídas por outras moléculas como anticorpos monoclonais projetados sob encomenda e com nova especificidade. No entanto, a produção e comercialização de EPOr ainda movimenta no mercado financeiro bilhões de dólares, sendo muito atrativa para diversas empresas biotecnológicas. O método de eleição para a produção de EPOr ainda é o cultivo de células de mamíferos que é um processo caro. Por tanto, uma alternativa para a produção dessa proteína recombinante no leite seria muito bem aceita pela indústria farmacêutica (CASTRO et al., 2010). É considerado como grande desafio a produção de uma EPOrh de alta atividade biológica e altos níveis de expressão.

Apesar das dificuldades em expressar proteínas recombinantes complexas no leite, já existem exemplos como a antitrombina III que foi produzida no leite de cabras transgênicas pela GTC Biotherapeutics e a sua utilização aprovada pelo FDA desde 2009 (Quadro 3). A antitrombina III se encontra em diversos fármacos recombinantes produzidos no leite que estão em testes clínicos avançados ou já foram aprovados para comercialização (Quadro 3). Os dados desse quadro não são completos e foram adaptados dos sites das empresas e dos dados apresentados no trabalho de CASTRO et al. (2010).

Produto	Espécie/Método	Status Clínico	Empresa
a-1 antitripsina	Ovelhas transgênicas	Fase III	Bayer-PPLARC
Antitrombina II	Cabras transgênicas	Aprovado pela EMEA (2006) e FDA (2009)	GTC Biotherapeutics
C1 inibidor	Cabras transgênicas	Fase III	Pharming BV
Alfa glucosidase humana	Coelhos transgênicos	Fase III	Pharming BV
E2-his	Cabras/não-transgênicas	Testes a campo	Heber Biotec

Fonte: Adaptado de CASTRO et al., 2010

Quadro 3 - Sumário de algumas proteínas produzidas no leite e seus status em teste clínicos avançados ou finalizados

2.3.4 O uso de pequenos ruminantes não transgênicos como biorreatores para a produção de biofármacos no leite

O uso de modelos transgênicos para produção de proteínas recombinantes no leite, mesmo que intermediários, utilizando animais de laboratório e coelhos, são caros. Como alternativa, foram desenvolvidos os sistemas baseados em animais não transgênicos. Teoricamente ocorreria redução dos custos e a produção da proteína recombinante em concentrações elevadas, as quais não agiriam de forma sistêmica no organismo do animal. O primeiro método desenvolvido foi baseado na transdução da glândula mamária de ratos e cabras com vetores adenovirais (HIROSE et al., 2007).

O princípio da técnica é bastante simples. As células epiteliais mamárias apresentam o receptor Cocksackie (CAR), em sua superfície basolateral, que é reconhecido pelo adenovírus. Para que a transfecção ocorra, é necessária a lavagem prévia da glândula mamária com solução salina e em seguida é preenchida com meio de cultivo com altas titulações virais. O DNA viral tem acesso às células epiteliais, onde é transcrito, convertido em proteínas e secretado no leite (CASTRO et al., 2010). Utilizando essa abordagem foi possível transduzir a glândula mamária de cabras lactantes, direcionando de forma eficiente a expressão gênica e obtendo concentrações elevadas (maiores que 1g/l) das proteínas recombinantes de interesse no leite (TOLEDO et al., 2005). Essa técnica também permitiu que fosse

detalhada a caracterização do padrão de glicosilação da EPOrh expressa no leite (30, 44, 45). Esse modelo é totalmente flexível e, em princípio, qualquer proteína pode ser modelo transgênico.

Um sistema adenoviral foi utilizado por Toledo et al. (2005) para expressar EPOrh no leite de cabras, verificando alta expressão protéica da EPOrh. Nesse trabalho o vetor adenoviral foi construído e utilizado para a transdução da glândula mamária de cabras em início da lactação. A máxima expressão foi detectada por Western-blotting no dia um da ordenha (1,6g/l), sendo que ocorreu até o 8º dia de ordenha. Foram realizados ensaios de atividade da EPOrh produzida no leite, comparando o resultado com EPOrh produzida por cultura celular (CHO). Verificou-se menor atividade para o grupo produzido no leite, já que apresentava menor glicosilação. Além desse modelo para a transdução da glândula mamária existe outro método para obter um animal não transgênico capaz de produzir proteínas recombinantes no leite. Düncher et al. (2002) estabeleceram nova técnica de transferência gênica para células da glândula mamária em ovinos baseada na eletroporação.

Durante a eletroporação, pequenos poros são criados na membrana celular, permitindo a entrada do DNA exógeno. Esse DNA exógeno poderá ser incorporado no DNA da célula, durante o processo de divisão (FRESHNEY, 1994). O período máximo de expressão do hormônio de crescimento humano foi de 15 dias após a transfecção, sendo que a maior expressão (150ng/ml) ocorreu no dia 4 aproximadamente. Esse método apresentou menor potencial para a expressão protéica do que o adenoviral, no entanto a execução é mais simples já que se utiliza qualquer vetor plasmideal.

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Nesse trabalho foram estabelecidas as seguintes hipóteses e objetivos.

3.1 HIPÓTESES

As hipóteses testadas nesse estudo foram:

1. A digestão enzimática é mais eficaz que a fragmentação de tecido mamário ovino para o estabelecimento de uma cultura de células epiteliais mamárias com capacidade de expressão de proteínas do leite.
2. A suplementação do meio de cultivo com o soro de ovelha lactante (SOL) e presença de Matrigel® como matriz extracelular, para o cultivo de células mamárias ovinas *in vitro*, são fatores estimulantes para expressão gênica da α -caseína, β -caseína, κ -caseína e β -lactoglobulina.
3. É possível produzir EPOrh no leite de ovelhas não transgênicas com a transfecção intra-mamária retrógrada com plasmídeos (construídos com a seqüência gênica da EPOh) seguida de eletroporação *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Estabelecer cultivo de células mamárias ovinas.

2. Manter as células em cultivo até 12^a passagem avaliando morfologia celular.
3. Caracterizar a 12^a passagem por imunocitoquímica dos filamentos intermediários (vimentina e citoqueratina).
4. Determinar a curva de crescimento celular da 12^a passagem durante o tratamento com SOL ou SFB.
5. Verificar por PCR em tempo real a expressão de genes relacionados com a produção de leite pelas células mamárias ovinas após tratamento com SOL ou SFB na presença ou não de Matrigel®.
6. Estabelecer um sistema de produção de EPOrh no leite de ovelhas não transgênicas pela técnica de infusão plasmideal intra-mamária *in vivo* seguida de eletroporação.
7. Verificar a expressão qualitativa por Western-Blotting do EPOrh produzida no leite de ovelhas não transgênicas, após a transfecção por dois plasmídeos diferentes, seguida de eletroporação.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a execução deste trabalho foram realizados experimentos *in vivo* e *in vitro*. O primeiro grupo de experimentos baseou-se no estabelecimento e análises das culturas de células mamárias ovinas sendo testadas as hipóteses 1 e 2. Já no experimento *in vivo* foi estabelecido um novo modelo não transgênico para a expressão de EPOrh no leite de ovelhas, sendo testada a hipótese 3.

4.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Nos experimentos *in vitro* foram estabelecidas duas linhagens de cultura de células de mamária ovinas.

4.1.1 Obtenção da biópsia de parênquima mamário e estabelecimento da cultura celular primária

Para a obtenção do parênquima mamário, uma ovelha Santa Inês entre 3 a 4 anos de idade e 90 dias de gestação foi anestesiada com a aplicação endovenosa de quetamina (15mg/Kg) e xilasina (200µg/Kg). Um fragmento de aproximadamente 2cm³ foi removido cirurgicamente e transportando em 5ml de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-GIBCO®) com 20% de SFB (GIBCO®) até o laboratório.

Em um fluxo laminar o fragmento foi lavado em solução de PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ estéril (Anexo A.A) três vezes. Após as lavagens, a biópsia foi transferida para uma placa de petri de vidro estéril e reduzida a fragmentos extremamente pequenos com auxílio de uma tesoura cirúrgica de ponta fina. A massa resultante foi dividida em dois grupos. Apenas um deles foi submetido à digestão enzimática.

Os fragmentos do grupo não digerido, linhagem não digerida (LND), foram cultivados em placa de Petri de 100mm (Corning®). Já o grupo da linhagem digerida (LD) foi novamente macerado pela passagem através de uma peneira de chá estéril e depois mantido por 45min a 37°C em meio de digestão: meio TCM-199 Hepes (Gibco®) acrescido de 0,02% de Tripsina (Sigma®) e 1% de Colagenase A (Sigma®) e 1% de Hialuronidase (Sigma®), sendo a solução homogeneizada por inversão a cada 5min. Após a digestão, foi adicionado meio de cultivo (Anexo A.B) para a inativação das proteinases. Essa solução foi centrifugada a 84x g/5min. e o sobrenadante descartado. O sedimento formado foi ressuspensionado em meio de cultivo e alocado em duas placas de Petri de 60mm (Corning®). Todas as placas de cultivo foram mantidas por sete dias a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade, sendo o meio de cultivo trocado a cada 48-72h.

Após atingir a semi-confluência, o meio foi retirado das placas que foram lavadas com 2ml de PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺, sendo adicionados 2ml de solução de tripsina (Anexo A.C) aquecida (37°C). As placas com tripsina foram mantidas sobre mesa aquecedora (37°C) durante aproximadamente 2min. Após verificar com auxílio de microscópio invertido que a matriz extracelular estava digerida, foram adicionados 2ml de meio de cultivo para a inativação enzimática. Foi utilizado um Disposable Cell Scraper (Costar®) para a remoção de todas as células que ainda estavam aderidas. O meio contendo as células em suspensão foi transferido para um tubo cônico de 15ml e centrifugado a 84x g/5min. Todo o sobrenadante foi removido, sendo o sedimento ressuspensionado em meio de cultivo e transferido para placas de Petri de 60mm (Corning®). Foram mantidas as mesmas condições de cultivo previamente descritas sendo o meio trocado a cada 48-72h. Esse procedimento foi repetido até a passagem número 3 (P3), sendo considerada como o ponto da mudança de passagem o procedimento de tripsinização. A partir da P3 observou-se células individualizadas e ausência de fragmentos, sendo realizada a criopreservação na P4. Para a realização desta, o sobrenadante foi removido e as células aderidas foram lavadas com 2ml de PBS. Realizou-se a tripsinização das células seguindo o protocolo já previamente descrito. Após a centrifugação, as células foram suspensas em 1ml de meio de cultivo e 100µl da solução foi adicionado a 100µl solução de Triplan-Blue (5mg de Triplan Blue/ml de solução salina) para verificação da viabilidade celular e determinação da concentração celular.

A concentração e a viabilidade celular foram calculadas com o auxílio de câmara hematómica preenchida com 10µl da solução, previamente homogenizada, em cada lado. Foram contadas as células, que não apresentavam lesão de membrana (permaneciam sem coloração azulada), presentes em 4 quadrantes de 1mm² em aumento de 40x em microscopia óptica. Para a determinação da concentração de células viáveis em cada amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

número total de células viáveis =

$$\left(\frac{\text{média de células viáveis}}{4} \right) \times 10.000 \times \text{diluição} \times \text{volume total da amostra}$$

Após a determinação da concentração, realizou-se uma centrifugação (84x g/5min) sendo posteriormente o sobrenadante retirado. As células foram novamente suspensas em meio de congelação a 4°C (Anexo A.D) e aliqüotadas (1x10⁶ células em 1ml) em criotubos de 1.5ml. Esses foram alocados no Mr. Frost (Nalgene®) gelado (-20°C), que foi armazenado no freezer -80°C por no mínimo 48h. Nestas condições a temperatura das células diminui 1°C/min até que a temperatura final seja atingida (-80°C). Após as 48h, as amostras foram transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) até a sua utilização.

4.1.2 Estabelecimento das passagens celulares

Foram descongelados três criotubos, de cada linhagem (LND e LD), por 30s à temperatura ambiente seguidos por 30s a 37°C, sendo cada grupo diluído em 6ml finais de meio de cultivo. As amostras foram centrifugadas (84 x g/5min) por 3min, o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 6ml de meio de cultivo. Foi estabelecida a relação de 1 placa de cultivo de 60mm (Corning®) para cada criotubo descongelado. A cultura celular em P4 foi incubada a 37°C em atmosfera

úmida com 5% de CO₂ até a confluência de 70 a 80% ser atingida, sendo o meio de cultivo totalmente trocado a cada 48-72h.

Com a verificação da semi-confluência as células foram tripsinizadas, conforme o protocolo já descrito, sendo cultivadas em placas de 100mm (Corning®). Foi utilizada uma placa de 100mm para cada uma de 60mm da passagem anterior. A cultura foi mantida até a sétima passagem. As células dessa passagem foram tripsinizadas, conforme o protocolo já descrito e a concentração de células viáveis determinada. As células da P8 foram criopreservadas (1×10^6 células em 1ml de meio de congelação – Anexo A.D) nas mesmas condições anteriores. Estes procedimentos foram repetidos durante todas as passagens celulares até criopreservação da P12.

4.1.3 Cultivo das linhagens na passagem 12 com diferentes meios e Matrigel

Foi analisada a expressão gênica de 5 genes da P12 de ambas as linhagens sob ação de quatro tratamentos: 1) cultivo com meio acrescido de 10% de SFB (Anexo A.B), 2) cultivo com meio acrescido de 10% de SOL (Anexo A.E), 3) cultivo com meio acrescido de 10% de SFB em placa recoberta com Matrigel® e 4) cultivo com meio acrescido de 10% de SOL em placa recoberta com Matrigel®. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

O cultivo foi efetuado em placas de 6 cavidades (Corning®) sendo realizada, com 40min de antecedência, a cobertura do fundo da placa com 1ml de Matrigel (1:20) em meio DMEM (Gibco®). Foram descongelados 4 criotubos de cada linhagem em P12 sendo seguido o protocolo de descongelação anteriormente citado no item 4.1.2. Aproximadamente 2×10^6 células viáveis foram alocadas em cada poço com 2ml de meio de cultivo, seguindo os tratamentos propostos. As células foram cultivadas, nas mesmas condições usadas durante o estabelecimento das linhagens, até atingirem a semi-confluência sendo o meio trocado a cada 48 h.

Assim, as células foram tripsinizadas, a concentração de células viáveis estabelecida para cada poço em cultivo e as triplicatas foram unidas. As células de cada grupo foram colocadas em um criotubo (2×10^6 células/criotubo) que foram

centrifugados a 84x g/5min. O sobrenadante foi removido e os criotubos imediatamente armazenados em nitrogênio líquido até sua utilização.

4.1.3 Reações de polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real).

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para os seguintes genes ovinos que codificam proteínas secretadas no leite: β -globulina, α -caseína, β -caseína, κ -caseína e como controle endógeno para as reações GAPDH (Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) e β -actina (Quadro 4).

Gene	F ou R	Seqüência
β -lactoglobulina	F	GAAATTCGACAAAGCCCTCA
β -lactoglobulina	R	GGCAGGGGCTCACCTAGAC
α -caseína	F	ACTTCTCATCCTTACCTGTCTT
α -caseína	R	GGGCACATCTTCCTTTTGA
β -caseína	F	ATGCCTCCTGCACCACCA
β -caseína	R	AGTCCCTCCACGATGCCAA
κ -caseína	F	ATGCCTCCTGCACCACCA
κ -caseína	R	GCATTTGCGGTGGACGAT
GAPDH	F	AATCCCTGCCATCAATACCA
GAPDH	R	CAGACAACCTGGCCAAAGGAT
β -actina	F	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT
β -actina	R	GGGCAGTGATCTCTTTCTGC

F = "forward"; R= "reverse".

Quadro 4 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para RT-PCR tempo real - São Paulo – 2010

Para a extração do RNA das amostras foi utilizado kit comercial Illustra RNAspin mini (GE Healthcare®, Buckinghamshire, Reino Unido), sendo seguidas as orientações do fabricante. Para a extração do RNA as membranas celulares foram rompidas pela variação de temperatura, colocando a amostra em nitrogênio líquido e deixando em temperatura ambiente por repetidas vezes. Após a ruptura das membranas, foi

adicionada solução RA1 com β -mercaptoetanol e a viscosidade das amostras foi reduzida pelo uso de uma coluna para a retenção de todos os “debris” celulares. Os filtrados foram então tratados para a sua purificação com o auxílio de outra coluna. Esta por sua vez, reteve o RNA presente na amostra que foi eluído com água, após ser tratado com soluções de lavagem e RNAase.

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA), sendo analisadas também a suas absorbâncias. A síntese do cDNA foi realizada com o uso do Kit comercial SuperScript® First Strand (Invitrogen®) e as orientações do fabricante foram seguidas. Na primeira etapa desse procedimento, foi realizada uma mistura com o 8 μ l do RNA de interesse, mix de dNTP e oligonucleotídeos de oligo dT, sendo esta incubada a 65°C por 5min e depois 1min a 0 °C. Foi então adicionado, em cada amostra, cloreto de magnésio e DTT ocorrendo uma incubação a 42° por 2min. Ao fim desse tempo, adicionou-se a enzima transcriptase reversa e a amplificação dos fragmentos de cDNA foi realizada a 42° por 50min e a 70°C por 15min. Ao final da reação, adicionou-se RNAase para degradar qualquer contaminação com RNA (37 °C por 20min). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C e analisado por PCR em tempo real no sistema de detecção Mastercycler ep Realplex (Eppendorf®).

Foram realizadas triplicatas de reação de PCR em tempo real para cada gene sendo utilizado para cada reação: 0,4 μ l de cDNA proveniente de uma solução com 1 μ g de RNA, 5 μ l de SyberGreenER™ qPCR Supermix Universal (Invitrogen®), 800 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (2 μ l) e 3 μ l de água ultra-pura (Sigma®). Para cada gene, foram realizadas duas reações como controle negativo (todos os reagentes presentes em uma reação, sendo o volume relativo ao cDNA substituído por água ultra-pura).

Todas as reações foram submetidas às seguintes condições, utilizado o equipamento Realplex² Mastercycler ep Gradient S: 50°C por 2min, 95°C por 10min, 95°C por 15s, 60°C por 15 s e 68°C por 20s, sendo as últimas três etapas foram repetidas 45 vezes. Em seguida as amostras foram novamente aquecidas a 95°C por 15s e resfriadas a 60°C por 15 s. quando então foi realizada uma curva de dissociação de 60°C para 95°C em 20min (Figura 4).

A padronização da reação de PCR em tempo real para verificar a expressão gênica de proteínas do leite foi descrita no apêndice A. Já a determinação das curvas de eficiência para cada gene está descrita no apêndice B.

$$\text{Razão da expressão }_{\text{normalizada}} = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta \text{ct} (\text{grupo testato} - \text{grupo referência})}}{E_{\text{endógeno}}^{\Delta \text{ct} (\text{grupo testato} - \text{grupo referência})}}$$

E = eficiência média do PCR para cada “primer”;
Ct = ciclo que em cada curva de amplificação passa pelo “threshold”;
 Δ ct = diferenças entre as ct dos grupos testados e os referências.

Figura 4 - Programação do ciclo (temperatura, tempo e quantidade de repetições) para as reações de PCR em tempo real - São Paulo – 2010

4.1.4 Imunocitoquímica

Para a imunocitoquímica, aproximadamente 20.000 células das passagens 4 e 12 das linhagens LD e LND foram cultivadas sobre lamínula de vidro (22x22mm) estéreis com 2ml meio de cultivo (Anexo A.B), sendo alocada dentro de um poço de placas com 6 cavidades (Corning®). As células de ambas as linhagens foram cultivadas por cinco dias, sendo o meio trocado a cada 48h.

Após o quinto dia, as lamínulas foram lavadas três vezes por 10min cada com PBS (Anexo A.A) e fixadas com metanol por 10min a -20°C. Após a fixação as células foram incubadas com uma solução de PBS com 0,25% de Triton X-100 (Sigma®) durante 10min a temperatura ambiente. Após permeabilização, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS por 5min cada lavagem.

Para o bloqueio dos sítios antigênicos, as lamínulas foram recobertas com solução de bloqueio (Anexo B.A) por 30min a 37°C. Após a incubação, as soluções foram descartadas e todas as lamínulas foram incubadas em câmara úmida “overnight” a 4°C com 100µl de anticorpo primário anti-vimentina clone V9 (Sigma®) na diluição 1:40 ou anticorpo primário anti-citoqueratina clone K8,13 (Sigma®) na diluição 1:20. Ambos os anticorpos foram diluídos em uma solução de PBS com 1% de BSA (Albumina sérica bovina - Sigma®). Ao término dessa etapa, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS.

As lamínulas foram incubadas com 100µl anticorpo secundário (1:3.000 em PBS com 1% de BSA). O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo desenvolvido em cabra e conjugado a Isoticianato de Fluresceína (FITC - Sigma®). Essa incubação ocorreu durante 1h à temperatura ambiente e em sala escura. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes de 10min com PBS e então cobertas com Vectashield® contendo DAPI (4', 6 diamidino-2-fenilindola) (VECTOR®). As lamínulas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus IX81), sendo as imagens capturadas pelo programa Image Pro-Plus.

Para as duas linhagens celulares avaliadas foi realizado o controle negativo da reação. Para essas duas lamínulas, todas as etapas foram realizadas menos a incubação com o anticorpo primário, sendo substituído apenas por 100µl de PBS com 1% de BSA (Albumina sérica bovina - Sigma®).

4.1.5 Curva de crescimento

Para o estabelecimento da curva de crescimento foram realizados os mesmos procedimentos descritos por Dünchler et al. (1998), no entanto foram utilizados dois tratamentos para cada linhagem: meio de cultivo com 10% de SFB (Anexo A.A) ou com 10% SOL (Anexo A.E). Aproximadamente 10.000 células viáveis de cada linhagem foram descongeladas e alocadas em poços de placas de cultivo de 24 cavidades (Corning®). A proliferação foi determinada após 24, 48 e 96 e 192h após o início do cultivo, sendo todas as amostras realizadas em triplicatas.

Realizou-se a tripsinização das células seguindo o protocolo já previamente descrito. Porém, foi utilizado para cada poço 100µl de tripsina, 100µl de meio de cultivo para a inativação enzimática e pipetagem repetida (15 vezes) desses 200µl para que todas as células fossem recuperadas. Após a centrifugação (84x g por 5min), as células foram suspensas em 100µl de meio de cultivo, sendo 50µl da solução adicionados a 50µl uma solução de Triplan-Blue. A concentração e a viabilidade celular foram calculadas com o auxílio de câmara hematómetrica, sendo consideradas apenas as células que não apresentavam lesão de membrana como já descrito no item 4.1.1 desse documento.

4.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*:

Para o experimento *in vivo*, foi proposta a produção de EPOrh no leite de ovelhas não transgênicas.

4.2.1 Indução de ovulação, inseminação e diagnóstico de gestação dos animais

Sete ovelhas da raça Santa Inês entre 3 a 4 anos de idade e híginas tiveram a ovulação induzida por aplicação intramuscular de 2mg de dinoprost tometamina (Lutalyse®, Pfiser). As ovelhas foram rufiadas a cada 12h por 60h, sendo cobertas pelo carneiro toda vez em que o estro era confirmado. O diagnóstico da gestação foi realizado por ultrassonografia transretal aos 25 dias de gestação e confirmado no 2º mês de gestação por ultrassonografia transabdominal.

4.2.2 Seleção e clonagem dos plasmídeos

Para os experimentos foram utilizados plasmídeos sintetizados no projeto de doutorado (Projeto FAPESP: 05/01392-3) denominado “Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongos”. Nesse projeto foram construídos dois plasmídeos para a expressão de eritropoietina recombinante humana sendo utilizadas duas regiões promotoras diferentes: α -lactoalbumina e β -lactoglobulina bovina. Esses plasmídeos foram previamente seqüenciados e submetidos a uma digestão com enzimas de restrição para verificar a formação de fragmentos com tamanhos específicos. O plasmídeo com a região promotora da α -lactoalbumina (ALAC) foi digerido com a enzima XhoI e o plasmídeo com a região promotora da β -lactoglobulina (BGL) foi digerido com a enzima BamHI. Para cada digestão foi utilizado: 10 μ l de cada miniprep, 1 μ l da respectiva enzima (FastDigest, Fermentas®), 2 μ l de tampão e 7 μ l de água ultra-pura. Ambas as digestões foram mantidas a 37°C por 5min. Após a digestão, 10 μ l de cada amostra digerida e não digerida foram aplicados em um gel de agarose 1% e brometo de etídeo, sendo utilizado tampão de corrida para amostra com base em azul de bromofenol e glicerol e tampão TAE 1x. Foi utilizado como peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), sendo o tamanho das bandas verificado com transluminador com luz ultra-violeta. Ambos plasmídeos apresentaram o tamanho esperado: ALAC (8,5Kb) e BGL (7kb).

As colônias foram inoculadas em 5ml de meio de cultivo líquido (20g de LB Broth/litro de água - Invitrogen®) com 10µl de ampicilina (50µg/ml) incubadas overnight à 37°C sob agitação (180 rpm). Foi adicionado no dia seguinte mais 45ml de meio com antibiótico e após 8h 200ml em cada cultivo. Após 24h do início do cultivo, foram adicionados mais 2,25l de meio com antibiótico que foi mantido overnight sob agitação (180rpm) a 37°C.

No dia seguinte uma amostra (1,5ml) de cada um dos dois cultivos foi obtida e submetida à extração plasmideal pelo kit comercial Illustra PlasmidPrep Mini Spin, (GE Healthcare®), sendo seguidas as orientações do fabricante. As culturas bacterianas foram centrifugadas em garrafas de 500ml a 6.000x g por 15min a 4°C. Suspendeu o sedimento em 125ml de Tampão P1, adicionado 125ml de Tampão P2, misturando vigorosamente por inversão 4-6 vezes e incubando a temperatura ambiente por 5min. Foi adicionar 125ml de Tampão 3 gelado e misturado vigorosamente por inversão 4-6 vezes. Colocou-se a mistura no cartucho da QIAfilter acoplado em uma garrafa de vidro e a um sistema de vácuo, incubado- a a temperatura ambiente por 10min.

Adicionou-se 50ml de Tampão FWB2 ao cartucho e mexendo gentilmente o precipitado. Equilibrou-se a coluna QIAGEN-tip 10.000 aplicando 75ml de Tampão QBT e deixando-a encher com a gravidade. Aplicou o lisado filtrado na coluna QIAGEN-tip 10.000, deixando o filtrado passar pela coluna por força da gravidade. A coluna QIAGEN-tip 10.000 foi lavada com 600 ml de Tampão QC e o DNA foi eluído com 100ml de QF Tampão. Precipitou-se o DNA adicionando 70ml de isopropanol à temperatura ambiente e a amostra foi centrifugada (16.000x g por 30min) a 4°C. Lavou-se o sedimento com 10ml de etanol 70%, centrifugou e deixou-o secar por 10-20min, sendo o DNA foi dissolvido em tampão TE (Anexo C.A). Após a extração, as amostras dos plasmídeos ALAC e BGL foram novamente digeridas com as mesmas condições anteriores e analisadas por eletroforese em gel de agarose O DNA plasmideal extraído foi quantificado por espectrofotometria com Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware), analisado por eletroforese em gel de agarose, aliquoteado e armazenado a -20°C.

Para o plasmídeo ALAC foi necessária uma nova amplificação plasmideal em mais 2,5 litros de meio e a extração novamente realizada pelo kit comercial QIAfilter Plasmid Giga Kit (Qiagen®), sendo seguido o mesmo protocolo. O DNA plasmideal extraído foi quantificado por espectrofotometria com Nanodrop ND-1000 (Nanodrop

Technologies, Inc., Wilmington, Delaware), analisado por eletroforese em gel de agarose, aliquoteado e armazenado a -20°C .

4.2.3 Injeção plasmídeal via intramamária retrógrada seguida de eletroporação

Para a execução do experimento, foi previamente construído um eletrodo utilizando duas chapas de aço inoxidável (7x11cm) e um eletrodo de membro adulto humano em “clip” (Figura 5).

Figura 5 - Eletrodo construído para eletroporação de uma glândula mamária ovina - São Paulo – 2010

Foram utilizadas três ovelhas Santa Inês (entre 3 a 4 anos de idade), híginas e lactantes (20º dia de lactação), sendo considerada como unidade experimental cada teta (n=6). As ovelhas foram anestesiadas por via endovenosa com quetamina (15mg/Kg) e xilasina (200µg/Kg) e os tetos ordenhados manualmente até ficarem esgotados. Foi infundido em cada teta até ficar repleto o tampão HBS (10mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl) com 10µg/ml de plasmídeo ALAC (n=2), com 10µg/ml de plasmídeo BGL (n=2) e apenas o tampão (n=2) como controle. Após a infusão, o eletrodo foi posicionado para que o campo elétrico atingisse todo o tecido mamário

havendo uma distância de 5-8cm entre os eletrodos. Foi utilizado gel de eletrocardiograma para facilitar o contato entre o eletrodo e a pele. Três choques de 500 volts por 15ms seguidos por mais três choques com a polaridade invertida foram aplicados utilizando o equipamento BTX ECM 2001. Após a eletroporação, os animais ficaram sob observação até a recuperação anestésica e a volta da atividade ruminal. A primeira ordenha ocorreu após 24h do procedimento de transfecção da glândula.

4.2.4 Coleta e armazenamento das amostras de leite

As amostras de leite foram obtidas pela ordenha diária completa dos animais, realizada pelo período da manhã por 20 dias. Antes da ordenha era realizada a lavagem dos tetos e glândula mamária com água e sabão neutro e secagem com papel toalha. As amostras foram coletadas, armazenadas em tubos cônicos de 50ml identificados e conservados à -20°C. Todas as fêmeas foram mantidas com os filhotes durante 5h por dia no período da tarde, após a ordenha. Esse procedimento foi realizado para evitar que as fêmeas parassem de lactar.

4.2.5 Processamento das amostras de leite

As amostras foram processadas seguindo as orientações do Prof. Dr. Fidel Ovidio Castro, docente da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidad de Concepción, Chile. Ele relatou a detecção de EPOrh no leite de cabras utilizando o protocolo descrito em Toledo et al. (2005).

As amostras (2ml) de leite (dias 1, 4, 7 e 10 da ordenha de todos os tetos dos 3 animais) foram descongeladas em gelo e depois diluídas 5 vezes em uma solução 100mM de EDTA e 150mM NaCl, para a destruição das micelas de caseína. O leite diluído foi acidificado para um pH de 4 pela adição de ácido hidrocloreídrico sob agitação a 4°C.

O material precipitado foi removido por uma centrifugação de 7.280x g por 30min. O sobrenadante foi precipitado com a adição de 50% de sulfato de amônio por 1h a 4°C. As proteínas precipitadas foram separadas por centrifugação a 7.280x g por 30min. Tanto o sobrenadante quanto o precipitado dessa última etapa foram conservados a -20°C para posterior análise.

4.2.6 Western-blotting para a detecção da EPOrh no leite

A padronização da reação de Western-blotting está descrita no apêndice C. Foram utilizadas como amostras o leite dos dias 1, 4, 7 e 10 após transfecção de todas as ovelhas de ambos os tetos. Todas as amostras foram analisadas em sua forma pura e também após o tratamento indicado pelo Prof. Dr Castro, sendo analisado tanto o sobrenadante quanto o precipitado obtido na última etapa do processamento.

Inicialmente foi adicionado o líquido de Laemmli (Anexo D.A) nas amostras na diluição de 1 parte de tampão para 2 de amostra. Elas foram aquecidas a 100°C por 5min e carregadas (30µl) em géis de policrilamida 15% (Anexo D.B) com 1mm de espessura para a realização da SDS-PAGE unidimensional, sendo utilizado o sistema de eletroforese de mini gel (Bio-Rad). As corridas ocorreram por 1h 30min com 120 volts e 400mA. Em todo o gel foi utilizado como controle positivo 10µl de Eritromax® (Blausiegel), controle negativo (20µl de leite controle) e 5µl de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Ladder, Fermentas®). O lote do medicamento utilizado apresentava uma concentração de 90,55µg de EPOrh/ml.

Após a eletroforese realizou-se a transferência das proteínas presentes no gel para membranas de polivinil Hybond-P (Amersham Biosciences®) pelo sistema úmido (Bio-Rad) por 1h e 40min, sendo utilizado 150volts e 400mA em solução de transferência (Anexo D.C). A verificação da transferência foi realizada pela coloração da membrana com solução de Ponceau-S. As membranas foram bloqueadas por 5h à temperatura ambiente com uma solução com 10% de leite em pó desnatado e 1% de albumina sérica bovina (BSA-Sigma®) em solução basal (Anexo D.D). As membranas foram incubadas “overnight” a 4°C com o anticorpo primário anti-EPOrh

(MAB287 – R&D System®) em uma diluição de 1:500 em solução basal com 10% de leite em pó desnatado. As membranas foram lavadas 3 vezes de 10min com solução basal e então incubadas com o anticorpo secundário.

A incubação com anticorpo secundário anti IgG de camundongo marcado com HRP (PerkinElmer®) na diluição (1:5.000) em solução basal com 10% de leite em pó desnatado ocorreu por 4h. As membranas foram lavadas 3 vezes (10min cada) com solução basal. Para a ativação da fluorescência foi utilizando o kit ECL Western-Blotting Substrat (Pierce®), sendo seguidas as instruções do fabricante. Nesse caso, foi utilizado para cada membrana 2ml de solução A mais 2ml de solução B. As duas foram misturadas em um tubo cônico, a membrana recoberta pelos 4ml resultantes e incubada durante 1min. Após o término desse período, o excesso da solução foi removido e a membrana envolta em um filme plástico de polivinil para a detecção da quimiluminescência. Essa foi realizada em filme radiográfico (Kodak®) com diferentes tempos de exposição: 2min, 5min, 10min e 20min.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação da expressão dos genes β -lactoglobulina, α -caseína, β -caseína e κ -caseína nos diferentes tratamentos foi usado o teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (*Pair wise fixed reallocation randomisation test*) utilizando o “Relative Expression Software Tool” (REST). O nível de significância adotado foi de 0,001.

Os dados obtidos da curva de crescimento foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000). Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\log_{10}X$; Raiz quadrada - $\sqrt{X}$; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, a análise de variância não paramétrica. O teste t de Student e o teste de Wilcoxon foram utilizados para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente.

Os dados relacionados ao crescimento celular foram obtidos através da análise de regressão linear, sendo utilizado o “*slope*” como medida do crescimento celular por hora. Esta variável obedeceu à normalidade dos resíduos apenas após a transformação de seus dados para logaritmo na base 10. Estes dados foram então analisados através de um fatorial 2x2, sendo os fatores soro (SFB e SOL) e linhagem celular (LD e LND). Através do PROC GLM, foram avaliados os efeitos do soro, da linhagem celular e da interação entre estes fatores.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias, seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média), as medianas e os quartis inferior e superior dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

5 RESULTADOS

Foram estabelecidas duas linhagens de células mamárias ovinas. No entanto, não foi possível a produção de EPOrh no leite das ovelhas não transgênicas.

5.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

As duas novas linhagens celulares, LND e LD, foram cultivadas até a P12 analisada sua morfologia em todas as passagens. Também foram avaliadas na P12 a caracterização de filamentos intracelulares, a velocidade de crescimento e a expressão gênica de proteínas do leite.

5.1.1 Estabelecimento, manutenção e caracterização morfológica das linhagens celulares

Foi possível estabelecer as linhagens LND e LD até a P12, sendo que em ambos os tratamentos o crescimento celular derivou dos fragmentos de tecido e obteve-se uma cultura homogênea apenas na P3. Para a LND, observou-se que esses fragmentos eram de duas a três vezes maiores que os da LD.

O tempo para atingir a semi-confluência foi de aproximadamente 15 dias para as passagens 0, 1 e 2. A partir da P3 o tempo foi reduzido para 10 dias até a P5. Para a LND o tempo entre as passagens foi mantido em 7 dias entre a P5 e P12 durante os 8 meses de cultivo. Para a LD a mesma frequência foi mantida até a P10, sendo que após essa etapa a média foi de 17 dias. Não foi apenas o tempo para o estabelecimento das passagens que se alterou durante o cultivo, mas também a quantidade de criotubos (1.000.000 células viáveis/criotubo) gerados por placa de 100mm em semi-confluência. Durante todo o período quantidade foi de 3-3,5 criotubos para a linhagem LND. Para a linhagem LD essa proporção foi mantida até

a P11, quando passou para 1 criotubo por placa. Já para P12 essa proporção foi ainda menor (0,5 criotubo por placa). É importante salientar que todas as passagens de ambas linhagens foram cultivadas sob as mesmas condições. As placas foram avaliadas a cada troca de meio de cultivo (48 - 72h), sendo verificadas as diferenças morfológicas das duas linhagens. Na LDN desde a P4 foi possível observar a existência de dois tipos celulares: células mais delgadas com prolongamentos e células mais arredondadas com uma superfície maior. Também foi possível observar desde a P2 estruturas muito semelhantes às chamadas mamosferas (Figura 6, E). Esse padrão com heterogeneidade celular e presença dessas estruturas foi presente até a P12 da LND. A partir da P6, a heterogeneidade celular ficou mais evidente, pois as células arredondadas foram circundadas pelas delgadas formando agrupamentos celulares (Figura 6, C). As estruturas semelhantes às mamosferas apresentavam um tamanho superior em passagens mais avançadas, no entanto em menor número.

Figura 6 - Imagens representativas obtidas por microscopia óptica (Zeiss Axiovert S100) em aumento de 400 vezes pelo Programa Image Plus. A) Linhagem não digerida (LND em P4, observa-se a presença de dois tipos celulares; B) Linhagem digerida (LD) em P4; C) LND em P8, dois tipos celulares com a formação de aglomerados; D) LD em P8; E) LND em P12, estrutura semelhante à mamosfera e F) LD em P12, células delgadas e bem aderidas à placa de cultivo - São Paulo – 2010

Já a LD apresentou desde o início uma homogeneidade celular. Foram observadas predominantemente células delgadas e com prolongamentos. A partir da P10 essas células passaram a se aderir mais à placa (Figura 6), não sendo mais possível detectar a presença de estruturas semelhantes à mamosferas.

5.1.2 Cultivo das linhagens na passagem 12 com diferentes meios e Matrigel

As linhagens LND e LD foram cultivadas na P12 com meio acrescido com SOL ou SFB na presença ou não de Matrigel, sendo a quantidade total de células por amostra estabelecida (Quadro 5). No cultivo da LND todos os tratamentos apresentaram estruturas semelhantes à mamosferas (Figura 7, C). No entanto, essas estruturas apresentaram um tamanho menor e uma frequência mais baixa que nas passagens anteriores, cultivadas apenas com meio acrescido com SFB. Não se observou por microscopia óptica nenhuma diferença morfológica entre os grupos.

Já para a LD, a morfologia foi semelhante para todos os grupos, havendo apenas células delgadas bem aderidas à placa (Figura 7, D) ou ao Matrigel (Figura 7, B). Essas células se organizavam paralelamente formando massas que recobriam quase toda a placa. Não foi visualizada a presença de mamosferas em nenhum tratamento.

Número total de células			
Meio	Matrigel	LDN	LD
SOL	Não	3.600.000	2.200.000
SOL	Sim	3.520.000	2.730.000
SFB	Não	4.160.000	2.140.000
SFB	Sim	4.300.000	2.100.000

Quadro 5 - Número total de células obtidas com o tratamento das linhagens LD e LND cultivadas na P12 com os tratamentos com ou sem Matrigel e adição de SOL ou SFB no meio de cultivo - São Paulo – 2010

Figura 7 - Imagens representativas obtidas por microscopia óptica no aumento de 400 vezes (Zeiss Axiovert S100). A) Células da LND foram cultivadas em placa recoberta com Matrigel® (1:20) com meio de cultivo com 10% de SOL; B) Células da linhagem digerida (LD) cultivadas em placa recoberta com Matrigel® (1:20) com meio de cultivo com 10% de SOL; C) Células da LND foram cultivadas com meio de cultivo com 10% de SFB, presença de estrutura semelhante a mammosfera e D) Células da LD cultivadas com meio de cultivo com 10% SFB - São Paulo – 2010

5.1.3 Caracterização morfológica por imunocitoquímica dos filamentos intermediários (vimentina e citoqueratina)

Foi realizada a imunocitoquímica para P4 e P12 de ambas as linhagens com anticorpos primários anti-vimentina e anti-citoqueratina. Foi observado uma marcação positiva para ambos em P4, mas o mesmo não ocorreu para P12. Nas duas linhagens foram observadas marcações positivas para os anticorpos anti-vimentina e apenas a LND apresentou a marcação da expressão de citoqueratina. Nessa linhagem as células maiores e mais arredondadas foram marcadas para citoqueratina e as menores e mais delgadas para vimentina (Figura 8).

Figura 8 - Imagens representativas de imunocitoquímica com marcação de DAPI (azul que marca núcleo celular) e anticorpo secundário com FITC (verde) para vimentina e citoqueratina (filamentos intermediários citoplasmáticos). A) Células da linhagem não digerida (LND) na P12, células maiores e arredondadas marcadas positivamente para citoqueratina; B) Células da LND na P12, marcação de todas as células com DAPI; C) Células da LND na P12, células marcadas positivamente para presença de vimentina; D) Células da LND na P12, marcação de todas as células com DAPI; E) Células da linhagem digerida (LD) na P12, células marcadas positivamente para presença de citoqueratina; F) Células da LD na P12, marcação de todas as células com DAPI; G) controle negativo da LND e H) controle negativo para LD - São Paulo – 2010

5.1.4 Curva de crescimento

Foi realizada a curva de crescimento na presença de dois meios de cultivo (com 10% de SFB ou SOL) para as duas linhagens celulares, em triplicata, pelos períodos de 24, 48, 96 e 192h (Gráfico 2). O grupo da LND, quando cultivado com SFB por 192 h apresentou um aumento na concentração celular de aproximadamente 10 vezes (49.000 células/poço). No entanto, quando essa linhagem foi cultivada com SOL, o número final total de células foi de aproximadamente 21.000 por poço para os períodos de 96 e 192h de cultivo, o que representa 45% do total de células obtidas no período de 192h de cultivo com SFB. O número total de células do grupo da LD tratado com SFB às 192h foi de 26.750 por poço (57% do número de células no mesmo período para o grupo LND tratado com SFB). Para o grupo da LD tratado com SOL essa porcentagem foi de 55% do número de células no mesmo período para o grupo da LND tratado com SFB (25.000 células). O crescimento para o grupo da LD também se manteve igual entre os tempos 96 h e 192h.

Gráfico 2 - Número total médio de células das linhagens LND e LD com os tratamentos com meio adicionado com SOL ou SFB - São Paulo – 2010

Foi estabelecido como fator de crescimento o número de novas células por hora (Gráfico 3), sendo calculado a média, erro padrão, mediana e quartis (Tabelas 1 e 2) para a velocidade de crescimento celular nos 4 tratamentos.

Gráfico 3 - Média da velocidade de crescimento celular (célula/hora) com erro padrão para as linhagens LD e LND com o meio de cultivo acrescido com SOL ou SFB ($P < 0,05$) – São Paulo – 2010

Tabela 1 - Média com erro padrão e mediana com quartis da velocidade de crescimento celular para as linhagens LD e LND com o meio de cultivo acrescido com SOL ou SFB – São Paulo - 2010

Velocidade de crescimento celular			
	SFB	SOL	P
LND	256,22 ± 17,62^a 245,83 (232,25 - 290,58)	79,19 ± 7,78^b 85,87 (63,68 - 88,04)	0,0008
LD	111,95 ± 6,89^b 105,43 (104,71 - 125,72)	94,59 ± 13,21^b 81,61 (81,16 - 121,01)	0,3086

Tabela 2 - Média com erro padrão e mediana com quartis da velocidade de crescimento celular com o meio de cultivo acrescido com SOL ou SFB para as linhagens LD e LND - São Paulo – 2010

Velocidade de crescimento celular			
	LND	LD	P
SFB	256,22 ± 17,62^a 245,83 (232,25 - 290,58)	111,95 ± 6,89^b 105,43 (104,71 - 125,72)	0,0016
SOL	79,19 ± 7,78^b 85, 87 (63,68 - 88,04)	94,59 ± 13,21^b 81,61 (81,16 - 121,01)	0,3721

Houve uma diferença do crescimento celular quando a LND foi cultivada com SFB ou SOL (P=0,0008), o mesmo não ocorreu para a LD (Tabela 2). Ocorreu o efeito da linhagem no cultivo realizado com SFB (P=0,0016), mas esse efeito não foi observado para o cultivo realizado com adição de SOL ao meio (Tabela 2).

5.1.5 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

Foi avaliada a expressão gênica de 4 genes (β -lactoglobulina, α -caseína, β -caseína e κ -caseína) relacionados à produção de leite e dois controles endógenos (β -actina e GAPDH) para as linhagens LD e LND cultivadas em meio com 10% de SFB (Gráfico 4). Ambas expressaram os genes GAPDH, β -actina, β -lactoglobulina e β -caseína. No entanto, a linhagem LD apresentou uma menor expressão relativa (P<0,01) para os genes relacionados ao leite. A linhagem LD foi a única a expressar o gene da κ -caseína. No entanto, nenhuma linhagem foi capaz de expressar a α -caseína.

Todas as outras 6 amostras (meio adicionado de SFB ou SOL, presença ou não de Matrigel e as duas linhagens celulares) foram analisadas para a expressão

de dos 6 genes por PCR em tempo real. Todas as amostras expressaram os controles endógenos (GAPDH e β -actina).

As amostras da LND de todos os tratamentos expressaram os genes da β -caseína e β -lactoglobulina. Todas as expressões foram comparadas com o controle LND cultivada em meio com 10% de SFB. O tratamento com meio adicionado com SOL sem Matrigel apresentou um aumento da expressão ($P=0,001$) da β -lactoglobulina. Para linhagem LD nenhum tratamento, além do com meio com SFB sem Matrigel, apresentou a expressão da β -caseína. A única amostra que expressou β -lactoglobulina foi a tratada com SOL sem Matrigel. Essa expressão foi comparada com controle (LD cultivada em meio com 10% SFB sem Matrigel), verificando-se um aumento da expressão ($P=0,001$). Esse aumento manteve-se significativo quando a expressão foi comparada com a LND cultivada em meio com 10% de SFB (Tabela 3).

Gráfico 4 - Imagem representativa da expressão dos genes GAPDH, β -actina, β -caseína, α -caseína, κ -caseína e β -lactoglobulina nas LND e LD cultivadas com meio acrescido de SFB. Curva de expressão (A) e curva de dissociação (B) - São Paulo – 2010

Tabela 3 - Eficiência da expressão dos genes analisados e média da razão da expressão com erro padrão - São Paulo – 2010

			β -lactoglobulina	α -caseína	β -caseína	κ -caseína
Eficiência*			1,99	1,99	1,98	1,99
Meio	Matrigel	Linhagem				
SOL	Sim	LD				
SOL	Não	LD	1,020 $\pm 0,00907$ $P=0,001$			
SFB	Sim	LD				
SOL	Sim	LND	1,093 $\pm 0,00504$ $P=0,505$	1,147 $\pm 0,00949$ $P=0,509$		
SOL	Não	LND	1,020 $\pm 0,00907$ $P=0,001$	0,989 $\pm 0,00602$ $P=0,484$		
SFB	Sim	LND	1,025 $\pm 0,00611$ $P=0,509$	1,033 $\pm 0,0092$ $P=0,492$		

* A eficiência para os genes GAPDH foi de 1,98 e da β -actina foi de 1,97.

5.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*

Foram sincronizadas e inseminadas sete ovelhas da raça Santa Inês, dois animais não responderam ao protocolo, sendo três animais utilizados no experimento. Uma ovelha morreu com 100 dias de gestação de actinobacilose e a sétima ovelha foi retirada do experimento pela morte de seu cordeiro com 5 dias de vida. O diagnóstico precoce da gestação teve 100% de acurácia sendo o seu resultado confirmado com o segundo diagnóstico aos 25 dias de gestação.

Ocorreu a seleção dos dois plasmídeos ALAC (8,5Kb) e BGL (7kb) pelo seqüenciamento gênico prévio e pela digestão diferencial com as enzimas de digestão BamH1a (BGL) e XhoI (ALAC), obtendo-se respectivamente fragmentos visualizados na figura 9 (ALAC apresentou 8,5Kb e o BGL 7kb). Para a extração e purificação foram utilizados aproximadamente 2,5 l de cultivo do plasmídeo BGL e 5 l de cultivo do ALAC para se obter 5mg de cada amostra. Esse material foi conservado 72 h a -20°C até sua utilização.

Figura 9 - Imagem representativa de gel de agarose 1% com brometo de etídeo através de transluminador com luz ultra-violeta A) 10µl plasmídeo ALAC após digestão com BamH1 e B) 10µl Plasmídeo BGL após digestão com Xho1

Para a transfecção, foi utilizada a sonda de infusão intra-mamária para bovinos não sendo observado nenhum tipo de refluxo do conteúdo ou mesmo lesão do tecido mamário. Após a infusão o teto apresentava um volume superior ao não infundido (Figura 10). Após a eletroporação, não foi observada nenhuma alteração do epitélio da região ou alteração de comportamento dos animais após a recuperação anestésica devido aos choques.

Figura 10 - A) Infusão intra-mamária retrógrada com auxílio de sonda intra-mamária bovina e seringa estéril de 60ml; B) Glândula mamária esquerda com o volume aumentado após a infusão; C) Eletroporação da glândula mamária esquerda e D) Glândula mamária após eletroporação - São Paulo – 2010

Todos os animais foram acompanhados durante a recuperação anestésica até a retomada da consciência e dos movimentos ruminais completos. Sendo a duração do procedimento descrito, da indução a recuperação anestésica, de aproximadamente 1 h para cada animal. Ao decorrer do período de ordenha, não foi observada nenhuma alteração em volume e aspecto do leite. Cada animal produzia aproximadamente 200ml de leite por teto. O western-blotting desenvolvido para detecção de EPOrh apresentou o limiar de detecção foi de aproximadamente 67,5 pg de EPOhr (Eritromax®) em leite de ovelha normal. Não foi possível observar a presença bandas referentes à EPOrh em nenhuma amostra analisada tanto do grupo tratado (sedimento ou sobrenadante) quanto do grupo em que se analisou apenas leite. Em todas as radiografias, o controle positivo estava presente.

6 DISCUSSÃO

O estabelecimento de culturas de células de glândula mamária ovina já foi descrito por Ilan et al. (1998) e Duchler et al. (1998). Nos dois trabalhos foram utilizadas linhagens imortais originadas de parênquima mamário de animais em gestação (80º dia) ou uma mistura de tecido de animais de diferentes idades. Esses tecidos foram digeridos com colagenase (DUCHLER et al., 1998) ou com colagenase e tripsina (ILAN et al., 1998) e cultivados por mais de 20 passagens. Foi relatada a expressão protéica de apenas β -lactoglobulina pelas duas linhagens que eram marcadas positivamente pelo anticorpo anti-citoqueratina.

O presente trabalho foi o primeiro relato do estabelecimento de uma linhagem de célula epitelial de glândula mamária ovina obtida a partir de parênquima não digerido (LND) que β -lactoglobulina, β -caseína e κ -caseína. As células da LD e LND expressaram β -lactoglobulina e β -caseína no cultivo com SFB sem Matrigel®. A expressão de β -lactoglobulina foi aumentada em ambas linhagens quando o SFB do meio foi substituído por SOL. A regulação da expressão de proteínas do leite na glândula mamária é um processo complexo que envolve regulação hormonal, a interação célula-célula e a célula matriz extracelular (STREULI et al., 1993), sendo que a principal proteína expressa no leite de ovelhas é a β -lactoglobulina.

Segundo Bruce e Whitelaw. (1995) o principal fator envolvido na produção dessa proteína nos estágios iniciais da lactação é o lactogênio placentário. Esse é membro da família da prolactina e dos hormônios de crescimento e foi capaz de aumentar a expressão dessa proteína *in vitro* (SERVELY et al., 1983; ENAME et al., 1986). Durante o segundo estágio da lactação o principal hormônio envolvido na produção de proteínas no leite é a PRL, sendo responsável pela expressão máxima de β -lactoglobulina (BURDON et al., 1994a). A PRL atua pela via intracelular através da família dos fatores de transcrição STAT (BURDON et al., 1994b). Esse hormônio também está relacionado com a produção de quase todas as proteínas expressas no leite (INUKUZA et al., 1999). Quando a PRL liga-se ao seu receptor (PRLr) na membrana celular é iniciada uma cascata de ativação intracelular. O primeiro fator a ser ativado é a tirosinaquinase associada ao receptor ("Janus Kinase 2 – JAK2) que fosforila outros elementos associados a essa cadeia como a STAT (INUKUZA et al., 1999). Essa via é a mesma utilizada pela EPO e pelo GH.

O STAT 5 ovino (STAT5o) foi descoberto como um fator de glândula mamária que estimula diretamente a produção de proteínas do leite em culturas de célula mamária murina (WAKAO; GOUILLEUX; GRONER, 1994). Inukuzuka et al. (1999) verificaram que quando STAT5o foi super-expresso em camundongos transgênicos ocorreu um aumento da expressão da β -caseína. A kinase p12 ativa (Pak1) também está relacionada com a produção de β -caseína, estabelecimento da morfologia alveolar mamária e lactação (WANG et al., 2003).

Outros fatores lactogênicos que estão envolvidos com a produção de proteínas pelas células mamárias como a hidrocortisona, insulina, estrógeno e progesterona são freqüentemente adicionados com a PRL no meio de cultivo. O IGF II e a insulina já foram relacionados com a proliferação de células mamárias epiteliais, não ocorrendo o crescimento da cultura de células epiteliais da glândula mamária de rato quando a concentração de insulina no meio era inferior a 10ng/ml (DEEKS; NANDI, 1988). Martin e Baldwin (2011) correlacionaram a presença de insulina no meio com a produção de caseína por cultura de células mamárias, apresentando um metabolismo semelhante às células *in vivo*. Já a hidrocortisona é necessária para a formação do retículo endoplasmático rugoso das células epiteliais mamárias, sendo essencial para a formação das proteínas do leite, mas não para as demais (ELINOR; TOPPER, 1969). O estrógeno é fundamental para a proliferação de células epiteliais mamárias e para o desenvolvimento dos ductos. No entanto, o desenvolvimento lóbulo-alveolar durante a gestação é dependente de progesterona. Os efeitos desses hormônios esteróides estão relacionados com a presença de seus receptores intranucleares nas células mamárias (CONNOR et al., 2007)

Assim como a adição de SOL no meio de cultivo estimulou a síntese de β -lactoglobulina, várias das vias anteriormente descritas provavelmente foram ativadas, atuando como a adição de insulina, hidrocortisona e PRL no meio de cultivo. Outro ponto de grande importância é que o SOL utilizado foi formado pela união de soro de ovelhas no dia do parto, com 15, 30 e 45 dias de lactação. Assim diferentes elementos regulatórios das duas fases de lactação como lactogênio placentário e PRL provavelmente estavam presentes. No entanto, para um estudo mais profundo na ação do SOL na estimulação da produção de proteínas do leite é necessário identificar os agentes lactogênicos presentes e suas concentrações.

Além dos elementos adicionados ao meio, a presença de matriz extracelular (colágeno ou Matrigel) também já foi correlacionada com a produção de proteínas

relacionadas ao leite, como a caseína (LEE et al., 1885). Matitashvili e Bauman (1999) verificaram a expressão de RNA em abundância para os genes α -caseína, β -caseína, κ -caseína e α -lactoalbumina em cultivo de células mamárias bovinas. Essa expressão foi máxima com a diferenciação celular com a presença de MEC para os 4 primeiros genes, sendo superior ao grupo em que a diferenciação foi realizada com colágeno ou colágeno mais Matrigel®. A presença do Matrigel permite que as células mamárias assumam uma formação bidimensional semelhante aos alvéolos mamários com a presença de células polarizadas (NOVIN; NDURI, 2007).

No entanto, nesse estudo não foi observado nenhum efeito do Matrigel® tanto na produção de proteínas do leite quanto na estrutura bidimensional que as células assumiam. Não foi observado nenhum aumento da expressão de β -lactoglobulina ou β -caseína nos grupos em que se utilizou essa MEC comercial. Para esse experimento, o Matrigel já havia sido usado em outro estudo piloto com células mamárias de outra linhagem, apresentando efeito na produção de proteínas do leite. No entanto, seria recomendada a repetição do experimento com um novo lote de Matrigel® em uma diluição menor (1:10) ao invés de 1:20, como o usado.

Caso o Matrigel® não apresente efeito novamente, supõe-se que algum tipo celular presente nas culturas, que ainda são iniciais quando comparadas com linhagens imortais, esteja produzindo MEC. Essa matriz supriria a necessidade das células epiteliais para a produção de proteínas como a β -caseína e β -lactoglobulina e suportaria a formação das estruturas celulares bidimensionais (mamosfera). É importante lembrar, que mesmo na ausência de Matrigel® e com SFB adicionado ao meio, as células da LND produziram β -caseína e κ -caseína que tem a sua produção estimulada pela presença da MEC (LEE et al., 1885). Além disso, essa linhagem apresentou em todas as passagens a presença de mamosferas e células marcadas positivamente para a vimentina e citoqueratina. A vimentina é um marcador de células de origem mesenquimal, não só as mioepiteliais, mas também fibroblastos. Para comprovar e diferenciar a presença de células que produzam MEC, como fibroblastos e células mioepiteliais, poderia ser realizada a imunocitoquímica com marcadores específicos para cada tipo celular.

A cultura da linhagem LDN foi marcada positivamente para vimentina e citoqueratina. No entanto, a outra linhagem de células mamárias ovinas (LD) foi marcada apenas para vimentina. Hu et al. (2009) descrevem o estabelecimento de uma nova linhagem de célula epitelial mamária bovina positiva para a marcação de

citoqueratina e vimentina. Segundo o autor, as células que apresentavam uma marcação para vimentina eram de origem mioepitelial. No presente estudo, as células da LND marcadas para vimentina também eram marcadas para citoqueratina. Também haviam células marcadas apenas para citoqueratina. Já a linhagem LD, apresentou marcação apenas para a vimentina indicando uma origem mesenquimal predominante.

Apesar da maioria dos estudos com o desenvolvimento de linhagens celulares mamária não citarem que as células mioepiteliais participam ativamente da morfogênese mamária, as células mioepiteliais são a segunda maior população presente no parênquima e influenciam a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células epiteliais além de modularem a interação entre o estroma e as células epiteliais (FARALDO et al., 2006). Assim como a MEC, as células mioepiteliais estão envolvidas na polarização das células luminais, sendo a adesão célula-célula importante nesse processo (BISSEL; BLDER, 2003). As células epiteliais são unidas entre si na região lateral-apical pela presença de desmossomos e por hemidesmossomos com a MEC (WEAVER et al., 2002). Em um estudo muito elegante, Runswick et al. (2001) incubaram células epiteliais com Matrigel ou com células mioepiteliais e verificaram que os desmossomos são essenciais para o estabelecimento de estruturas polarizadas. Os autores também concluíram que a presença de desmossomos é essencial para a formação de ácinos com uma camada dupla de células, mas que as moléculas presentes na MEC em geral não estão obrigatoriamente envolvidas no processo.

Já o estudo realizado por Gudjonsson et al. (2002) verificou que a adição de células mioepiteliais em uma cultura de células epiteliais mamárias em colágeno corrigiu a polaridade das células luminais. Os autores concluíram que um dos fatores essenciais para ocorrer essa correção foi a habilidade das células mioepiteliais em sintetizar laminina 1. Ambos os estudos determinaram fatores essenciais para a polarização celular. No entanto, Runswick et al. (2001) verificaram que o processo era dependente apenas dos desmossomos e Gudjonsson et al. (2002) que era dependente dos desmossomos e da habilidade das células mioepiteliais em secretar laminina 1.

No presente estudo a LND, na qual a não digestão manteve as interações célula-célula, sendo observada a presença de prováveis células mioepiteliais, houve uma maior eficiência na produção de β -lactoglobulina, β -caseína e κ caseína quando

comparada a LD. Esse efeito pode ser derivado da manutenção dos desmossomos e hemi-desmossomos entre as células desde as passagens iniciais e da produção de laminina 1 pelas células mioepiteliais. Os resultados obtidos por Runswick et al. (2001) explicariam o motivo pelo qual a adição de Matrigel nos tratamentos não teve efeito, já que a produção de proteínas do leite está diretamente relacionada com a estrutura bidimensional assumida pelo cultivo. É importante ressaltar que a LND apresentou mamosferas em todas as passagens e foi positiva para a marcação de vimentina e citoqueratina nas P4 e P12. Já a LD apresentou essas estruturas bidimensionais apenas nas passagens mais iniciais e foi positiva para a presença de citoqueratina apenas na P4.

Foi realizada a curva de crescimento para as duas linhagens celulares com meios acrescidos de SFB ou SOL. Para a linhagem LND observou-se uma maior proliferação para o grupo tratado com SFB quando comparado ao grupo tratado com SOL. O meio acrescido com SOL provavelmente não forneceu o microambiente adequado e nem todos os fatores necessários para que as células proliferassem. Assim esse meio poderia ser utilizado apenas por um curto período durante a cultura e não durante todo o seu estabelecimento. Já para a LD, ambos os tratamentos promoveram a mesma proliferação celular, que foi muito inferior a apresentada pelo grupo da LND tratado com SFB. Essa baixa taxa de proliferação pode ser um indicativo de senescência, a qual explicaria a baixa expressão de proteínas do leite na maioria dos tratamentos. Esses dois fatores fariam com que a LD na P12 não fosse uma boa escolha para ser utilizada em biorreatores, como cultura para teste de vetores ou como fonte de células para a doação de núcleo para a transferência nuclear. A LND seria a mais indicada para ser utilizada para esses fins, sendo antes necessário dar continuidade ao cultivo até a passagem 50 na tentativa de se criar uma linhagem imortal que possa ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica. Com os resultados obtidos nesse estudo, a digestão dos fragmentos de tecido para gerar uma cultura primária pode ser considerada um fator que altera as características muito relevantes para o estabelecimento de uma linhagem de células da glândula mamária, sendo mais indicado a não digestão do fragmento.

Já para o experimento *in vivo*, não foi possível observar a expressão de EPOrh no leite das ovelhas transfectadas. Cinco possíveis causas para a não expressão seriam: a não incorporação dos plasmídeos pelas células mamárias, incorporação mas a não inserção do plasmídeo no material genético, a inserção dos

plasmídeos no genoma celular mas não expressão protéica, a inserção dos plasmídeos no genoma celular com expressão protéica mas a não secreção ou uma baixa taxa de eficiência do processo gerando apenas poucas células capazes de expressar e secretar EPOrh no leite.

Os dois vetores utilizados BGL e ALAC foram seqüenciados e submetidos a digestão diferencial com enzimas de restrição. Para a amplificação dos plasmídeos em bactérias houve uma grande diferença no volume de cultura, sendo necessário o dobro do volume (5l) de cultivo para se obter 4mg do plasmídeo BGL. Essa variação pode ser derivada da diferença entre os tamanhos dos plasmídeos. Verificou-se que as seqüências gênicas relativas à EPO e as regiões promotoras estavam corretas, no entanto não foi realizado teste anterior da capacidade de expressão da EPOrh. Seria interessante verificar a capacidade de expressão *in vitro* em cultura de célula de glândula mamária bovina ou ovina capaz de expressar β -lactoglobulina (como a LND) para o plasmídeo BGL e α -lactoalbumina para o plasmídeo ALAC. Um novo experimento *in vivo* seria realizado apenas após verificar a capacidade de expressão dos plasmídeos.

A eficiência do processo de transfecção poderia ser aumentada pelo o uso de lipídios catiônicos ou de lipossomos. Essas moléculas envolveriam os plasmídeos e facilitariam a união com a membrana celular durante a eletroporação, mas o custo seria muito elevado. Para a realização do experimento *in vivo*, utilizando DOSPER® (Roche) como lipídio catiônico, seriam gastos aproximadamente 30.000 reais seguindo o protocolo descrito por Döcheler et al. (1998). Esse gasto só seria aceitável, se fosse comprovada a eficiência para a expressão protéica da EPOrh pelo menos de um vetor. Uma forma alternativa para a detecção de EPOrh no leite por Western-Blotting seria realizar ELISA por kit-comercial com eficiência comprovada para o extrato leite ou realizar imunohistoquímica para EPOrh em biópsias de glândula mamária em diferentes dias após a transfecção. Dessa forma seria possível detectar se a EPOrh estava sendo produzida pelas células e secretada para os ductos

7 CONCLUSÃO

A digestão enzimática foi menos eficaz do que a fragmentação de tecido mamário ovino para o estabelecimento de uma cultura de células epiteliais mamárias com capacidade de expressão protéica.

A suplementação do meio de cultivo com 10% SOL sem a presença de Matrigel foi um fator estimulante para as LD e LND para a expressão gênica apenas da β -lactoglobulina, sendo que os demais tratamentos não apresentaram efeito na expressão gênica das proteínas do leite analisadas.

Não foi possível produzir EPOrh no leite de ovelhas não transgênicas com a transfecção intramamária retrógrada com plasmídeos ALAC e BGL seguida de eletroporação *in vivo*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para estabelecimento da cultura de célula epitelial mamária foi estabelecido pelo cronograma inicial que seriam necessários aproximadamente 10 meses para o cultivo até a 20ª passagem. A primeira biopsia foi realizada em março de 2009 e o cultivo estabelecido até Janeiro de 2010. No entanto, após 17 passagens verificou-se a contaminação de todas as passagens anteriores com leveduras. A contaminação não foi verificada anteriormente, pois não apresentava aspectos típicos como a turvação do meio de cultivo. Assim, foi realizada uma nova biopsia em março de 2010 para o estabelecimento das novas linhagens, mas novamente ocorreu a detecção de uma mínima concentração de leveduras nas passagens iniciais. Em Abril foi realizada a terceira biopsia que originou as LD e LND.

Na terceira realização do cultivo primário utilizou-se um antifúngico no meio de cultivo (Fungizone®, Invitrogen) e não foi mais detectada a contaminação. Em contato com outros laboratórios que já realizaram cultivo primário de células de glândula mamária soube-se que essa contaminação é extremamente freqüente, já que essas leveduras fazem parte da microbiota natural presente nos ductos mamários (SPAHAMBERG et al., 2008). Assim, o cultivo que demoraria apenas 10 meses foi realizado em 22 meses de cultivo quase que ininterruptos.

Foram realizados alguns estudos em meados de 2009 com a P8 da primeira linhagem utilizando Matrigel. Como resultado preliminar obteve-se uma diferença entre os grupos com e sem Matrigel. Foi realizado o tratamento da LND e LD com o mesmo lote do Matrigel anteriormente testado, mas não foi observada efeito do Matrigel. Assim seria indicado a repetição do experimento *in vitro* com um novo lote de Matrigel e também em outras passagens como a P4 e P8 das duas linhagens. Repetindo o experimento para as diferentes passagens seria possível verificar se a expressão gênica das proteínas do leite se manteve, aumentou ou reduziu ao longo do tempo. Essa informação associada à curva de crescimento para cada passagem seria importante para determinar se as linhagens estão ou não evoluindo para imortalidade ou senescência.

Já para o experimento *in vivo*, são importantes algumas considerações como: não foi possível realizar o experimento com o lipídio catiônico DOSPER pelo seu custo e a próxima etapa seria o teste *in vitro* dos plasmídeos utilizados para verificar

a sua capacidade de induzir a produção de EPOrh. Foi realizado o ELISA para a detecção de EPOrh utilizando o mesmo anticorpo monoclonal para EPOrh utilizado no western-blotting. No entanto, não foi possível padronizar a reação, já que nem os controles positivos foram detectados.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A.; CASTRO-PALOMINO, N.; DE LA FUENTE, J. Expression of human erythropoietin transgenes and of the endogenous WAP gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation. **Transgenic Research**, v. 7, p. 311–317, 1998.
- ANDERSEN, C. R.; LARSON, B. L., Comparative maintenance of function in dispersed cell and organ cultures of bovine mammary tissue. **Experimental Cell Research**, v. 61, p. 24-30, 1970.
- ANDERSON, R. R. Mammary gland growth in sheep. **Journal of Animal Science. Savoy**, v. 41, p. 118-123, 1975.
- ANDERSON, E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, v. 4, p. 197-201, 2002.
- ARCHER, J. S.; KENNAN, W. S.; GOULD, M. N.; BREMEL, R. D. Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 6840-6844, 1994.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986, 984 p.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v. 59, p. 831-839, 2003.
- BALL, R. K.; FRISS, R. R.; SCHONENBERG, C. A.; DOPPLER, W.; GRONER, B. Prolactin regulation of b-casein gene expression and of a cytosolic 120kD protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. **EMBO Journal**, v. 7, p. 2089-2095, 1988.
- BAND, V. Preneoplastic transformation of human mammary epithelial cell. **Seminars of Cancer Biology**, v. 6, p. 185-192, 1995.
- BARCELLOS-HOFF, M. H.; AGGELER, J.; RAM, T. G., BISSEL, M. J. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultured of reconstituted basement membrane. **Development**, v. 105, p. 223-235, 1989.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Wool Technology Sheep Breeding**, v. 45, p. 182-220, 1997.

BIBILA, T. A.; ROBINSON, D. K. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 1-13, 1995.

BISSELL, M. J.; BILDER, D. Polarity determinations in breast tissue: desmosomal adhesion, myoepithelial cells, and laminin1. **Breast Cancer Research**, v. 5, p. 117-119, 2003.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**, New York, Marcel Dekker, 1997, 702p.

BOUJENANE, I.; LAIRINI, K. Genetic and environmental effects on milk production and fat percentage in D'man and Sardi ewes and their crosses. **Small Ruminant Research**, v. 8, p. 207-215, 1992.

BROUDY, V. C.; TAIT, J. F.; POWELL, J. S. Recombinant human erythropoietin: purification and analysis of carbohydrate linkage, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 265, n. 2, p. 329-336, 1988.

BRUCE, C.; WHITEHEAD, A. Regulation of ovine b-lactoglobulin gene expression during the first stage of lactogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 209, n. 3, p. 1089-1093, 1995.

BURDON, T. G.; MAITLAND, K. A.; CLARCK, A. J.; WATSON, C. J. Regulation of the sheep beta-lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon-gamma activation site-related element. **Molecular Endocrinology**, v. 8, p. 1528-1536, 1994a.

BURDON, T. G.; DEMMERS, J.; CLARCK, A. J.; WATSON, C. J. The mammary factor MPBF is a prolactin-induced transcriptional regulator which binds to STAT factor recognition sites. **FEBS Letters**, v. 350, p. 177-182, 1994b.

BURNS, S.; ARCASOY, M. O.; LI, L.; KURIAN, E.; SELANDER, K.; EMANUEL, P. D.; HARRIS, K. W. Purification and characterization of the yeast-expresses erythropoietin mutant Epo (R103A), a Specific inhibitor of human primary hematopoietic cell erythropoiesis, **Blood**, v. 99, n. 12, p. 875-889, 2002.

BUTLER, M. **Mammalian cell biotechnology: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1991.

- CAJA, G.; SUCH, X.; FERRET, A.; CASALS, R. Resultados preliminares de La comparación productiva de corderas Lacaune y Manchega em condiciones semi-intensivas. ITEA. In: JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL 5, 1993, Zaragoza, v. 12, p. 24-26.
- CARDELLINO, R. A.; BENSON, M. E. Lactation curves of commercial ewes rearing lambs. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 1, p. 23-27, 2002.
- CASTRO, F. O.; TOLEDO, J. R.; SÁNCHEZ, O.; RODRIGUEZ, L. All roads lead to Milk: transgenic or no-transgenic approaches for expression of recombinant proteins in mammary gland. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 38, n. 2, p: s615-s626, 2010.
- CHAN, S. Y.; LEMBACH, K. J. Characterization of recombinant BHK-21 endogenous particles: R-type particles. **Biologicals**, v. 22, p. 121-12, 1994.
- CHOMCYNSKI, P.; QASBA, P.; TOPPER, Y. J. Essential role of insulin in transcription of the rat 25 000 molecular weight casein gene. **Science**, v. 226, p. 1326-1328, 1984.
- CHUNG, B. S.; LEONG, Y. T.; CHANG, K. H.; KIM, J. S.; KIM, J. H. Effect of sodium butyrate on the glycosilation of recombinant erythropoietin, **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1087-1092, 2001.
- CLARK, A. J. Gene expression in the mammary glands of transgenic animals. **Biochemical Society Symposia**, v. 63, p. 133-140, 1998.
- CONNOR, E. E.; WOOD, D.L.; SONSTEGARD, T. S.; MOTA, A.F.; BENNETT, G.L. WILLIAMS, J. L.; CAPUTO, A. V. Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor α -1, estrogen receptors α e β and progesterone receptor in bovine mammary gland. **Journal of Endocrinology**, v. 185, p. 593-603, 2005.
- CONNOR, E. E.; MEYER, M. J.; LI, R. W.; VAN AMBURGH, M. E.; BOISCLAIR, Y. R.; CAPUCO, A. V. Regulation of gene expression in bovine mammary gland by ovarian steroids. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E55-E65, 2007.
- COWIE, A.; FORSYTH, I. A.; HART, I. C. Hormonal control of lactation. In: _____. **Monographs on Endocrinology**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1980. v. 15, p 1-275.
- SILVA, M. R. H., da. **Efeitos de diferentes taxas de crescimento da recria sobre o desempenho, idade a puberdade e produção leiteira em fêmeas da**

raça Santa Inês. 2009. 90 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

DAMM, J. B. L. 1988, The application of glycobiology of the generation of recombinant glycoprotein therapeutics. In: SUBRAMANIN, G (Ed.).

Bioseparation and Bioprocessing, 1ª ed., Weinheim: Wiley-VCH, 1988, v. 2, cap. 5.

DANNIELSON, K.; OBORN, C. J.; DURBAN, E. M. Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 81, p. 3756-3760, 1984.

DARCY, K. M.; BLACK, J. D.; HAHM, H. A.; IP, M.M. Mammary organoids from immature virgin rats undergo ductal and alveolar morphogenesis when grown within a reconstituted basement membrane. **Experimental Cell Research**, v. 196: 49-65, 2001.

DEEKS, S.; NANDI, R. J. Maintenance of normal rat mammary epithelial cells by insulin and insulin-like growth factor 1. **Experimental Cell Research**, v. 174, n. 2, p. 448-460, 1988.

DESPREZ, P. Y.; ROSKELLEY, C.; CAMPISI, J.; BISSEL, M. J. Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein ID-1. **Molecular Cell Differentiation**, v. 1, p. 99-110, 1995.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 17, p. 1-179, 2005.

DROHAN, W. M.; ZHANG, D. W.; PALEYANDA, R.K.; CHANG, R.; WROBLE, M.; VELANDER, W.; LUBON, H. Unefficient processing of human protein C in the mouse mammary gland. **Transgenic Research**, v. 3, n. 6, p. 355-364, 1994.

DÜCHLER, M.; SCHMOLL, F.; PFNEISL, F.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. Omec II: A new ovine mammary epithelial cell line. **Biology of the Cell**, v. 90, p. 199-205, 1998.

DÜCHLER, M.; PENG, M.; SCHÜLLER, S.; PFNEISL, F.; BUGINGO, C.; BREM, G.; WAGNER, E.; SCHELLANDER, K.; MÜLLER, M. Somatic gene transfer into the lactating ovine mammary gland. **The Journal of Gene Medicine**, v. 4, p. 282-291, 2002.

ELINOR, S. M.; TOPPER, Y. J. Mammary alveolar epithelial cells: effect of hydrocortisone on ultra structure. **Science**, v. 165, n. 3898, p. 1127-1128, 1969.

EMERMAN, J. T.; PITELKA, D. R. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. **In Vitro**, v. 13, p. 316-328, 1977.

EMERMAN, J. T.; VOGL, A. W. Cell size and shape changes in the myoepithelium of mammary gland during differentiation. **Anatomical Record**, v. 216, p. 405-415, 1986.

ENAME, M. N.; DELOUIS, C.; KELLY, P.A.; DIJANE, J. Evolution of prolactin and placental lactogen receptor in ewes during pregnancy and lactation, **Endocrinology**, v. 118, p. 695-700, 1986.

ETHIER, S. P.; MAHACEK, M. L.; GULLICK, W. L.; FRANK, T. S.; WEBER, B. L. Differential isolation of normal epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. **Cancer Research**, v. 53, p. 627-635, 1993.

FARALDO, M. M.; TEULI-ERE, J.; DEUGNIER, M.; HOSSERAYE, I. T.; THIERY, J. P.; GLUKHOVA, M. A. Myoepithelial cell in the control of mammary development and tumorigenesis: data from genetically modified mice. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10, n. 3, p. 211-219, 2006.

FENG, C.; KLEIN, C.; HEUR, C.; SIEGEL, U.; FRAUNE, E. Agitation aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. **Cytotechnology**, v. 11, n. 3, p. 233-244, 1993.

FORSYTH, I. A. The insulin-like growth factor and epidermal growth factor families in mammary cell growth in ruminants: action and interaction with hormones. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1085-1096, 1996.

FORSYTH, I. A.; TAYLOR, J. A.; MOORBY, C. D. DNA synthesis by ovine mammary alveolar epithelial cell: effects of heparin, epidermal growth factor-related peptides and interaction with stage of pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 56, p. 283-290, 1998.

FORSYTH, I. A.; KEABLE, S.; TAYLOR, J.A.; TURVEY, A.; LENNARD, S. Expression of amphiregulin in the sheep mammary gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 126, p. 41-48, 1997.

FOSTER, S. A.; GALLOWAY, D. A. Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. **Oncogene**, v. 12, p. 1773-1779, 1996.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 1994.

FUENTE, L. F.; SAN P. F.; FUERTES, J. A.; GONZALO, E. C. Daily and between-milking variations and repeatabilities in milk yields, somatic cell count, fat, and protein of dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 24, p.133-139, 1997.

GAMBHIR, A.; ZHANG, C.; EUROPA, A.; HU, W.-S. Analysis of the use of fortified medium in continuous culture of mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 31, p. 243-254, 1999.

GANGULY, R.; GANGULY, N.; METHA, N. M.; BENERJEE, M. R. Absolute requirement of glucocorticoid for expression of the casein gene in the presence of polactina. **Experimental Cell Research**, v. 77, p. 6003-6006, 1980.

GERMAN, T.; BARASH, I. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 38, p. 282-292, 2002.

GERTLER, A.; WEIL, A.; COHEN, N. Hormonal control of casein synthesis in organ culture of the bovine lactating mammary gland. **Journal Dairy Research**, v. 49, p. 387-398, 1981.

GIBSON, C. A.; VEGA, J. R.; BAUMRUCKER, C. R.; OAKLEY, C. S.; WELSCH, C. W. Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell lines. **In Vitro Cell Development Biology**, v. 27A, p. 585-594, 1991.

GOKANA, A.; WINCHENNE, J. J.; BENGHANEM, A.; AHADED, A.; CARTRON, J.P.; LAMBIN, P. Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms. **Journal of Chromatography**, v. 791, n. 1-2, p. 109-118, 1997.

GOLLOHON, L. S.; SHAY, J. W. immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53 (273his). **Oncogene**, v. 12, p. 715-725, 1996.

GORDON, K. E.; BINAS, B.; CHAPMAN, R. S.; KURIAN, K. M.; CLARKSON, R. W. E.; CLARK, A. J.; LANES, E. B.; WATSON, C. J. A novel cell culture model for studying differentiation and apoptosis in mouse mammary gland. **Breast Cancer Research**, v. 2, p. 222-235, 2000.

GREEN, M. R; PASTEWKA, J. V. Characterization of major milk proteins from BALB/c and C3H mice. **Journal Dairy Science**, v. 59, p. 207-215, 1976.

GUDJONSSON, T.; RONNOV-JESSEN, L.; VILLADSEN, R.; RANK, F.; BISSEL, M. J.; PETERSEN, O. W. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 39-50, 2002.

GUYETTE, W. A.; MATUSIK, R. J.; ROSEN, J.M. Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. **Cell**, v. 17, p. 1013-1023, 1979.

GUZMAN, R.; OSBORN, R.; YANG, J.; TDEORN, K.; NANDI, S. Transplantation of mouse mammary cells grown in primary collagen gel culture. **Cancer Research**, v. 42, p. 2376-2383, 1982.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E. J. R.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680-683, 1985.

HASSAN, H. A. Effects of crossing and environmental factors on production and some constituents of milkin Ossimi and Saidi sheep and their crosses with Chios. **Small Ruminant Research**, v. 18, p. 165-172, 1995.

HENS, J. R.; AMSTUTZ, M. D.; SCHANBACHER, F. L.; MATHER, I. H. Introduction of the human growth hormone gene into the guinea pig mammary gland by in vivo transfection promotes sustained expression of human growth hormone in the milk throughout lactation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1523, p. 161-171, 2000.

HIRONAKA, T.; FURUKAWA, K.; ESMON, P. C.; YOKOTA, T.; BROWN, J. E.; SAWADA, S.; FOURNEL, M. A.; KATO, M.; MINAGA, T.; KONATA, A. Structural study of the sugar chains of porcine factor VIII – Tissue- and species –specific glycosilation of factor VIII. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, n. 2, p. 316-330, 1993.

HIROSE, H.; TSUKADA, M.; HIRAYAMA, F.; KUBO, Y.; KAJII, M.; MOCHIZUKI, S.; HAMATO, N.; OHI, H. Recombinant human antithrombin expressed in Chinese hamster ovary cells shows in vivo efficient on rat DIC model similarly to plasma-derived antithrombin regardless of different H-glicosylation. **Trombosis Research**, v. 119, n. 5, p. 631-641, 2007.

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

HOVEY, .C.; MCFADDEN, T. B.; AKERS, R. M. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by mammary fat pad: a species comparison. **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 4, p. 53-68, 1999.

HU, H.; WANG, J.; BU, D.; WEI, H.; ZHOU, L.; LOOR, J. J. In vitro cultured and characterization of mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow. **PLoS ONE**, v. 4, p. e7636, 2009.

HURLEY, W.L.; BLATCHFORD, D.R.; HENDRY, K.A.K.; WILDE, C.J. Extracellular matrix and mouse mammary cell function: comparison of substrata in culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 30A, n. 8, p. 529-538, 1994.

HUYNH, H. T.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cell (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. **Experimental Cell Research**, v. 197, p. 191-199, 1991.

ILAN, N.; BARASH, I.; GOOTWINE, E.; SHANI, M. Establishment and initial characterization of the ovine mammary epithelial cell line NISH. **In vitro Cell Development Biology**, v. 34, p. 326-332, 1998.

INUZUKA, H.; YAMANOUCHI, K.; TACHI, C.; TOJO., H. Expression of milk protein genes is induced directly by exogenous STAT5 without prolactin-mediated signal transduction in transgenic mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 121-125, 1999.

JAE, Y. H. Germ cells and transgenesis in chickens. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Disease**, v. 32, n. 2, p. 107-121, 2009.

JECHLIGER, M.; PODSYPANINA, K.; VARMUS, H. Regulation of transgenes in three-dimensional cultures of primary mouse mammary cells demonstrates oncogene dependence and identifies cells that survive deinduction. **Genes Developmental**, v. 23, p. 1677-1688, 2009.

JENKINS, N.; PAREKH, R. B.; JAMES, D. C. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 8, p. 975-981, 1996

JENNESS, R.; SLOAN, R.E. The composition of milk. **Dairy Science Abstract**, v. 32, p. 599-612, 1974.

JOHNSON T.L.; FUJIMOTO, B.A.; FLORES, R.J.; PETERSON, D. Growth hormone alters lipid composition and increases the abundance of casein and

lactoalbumina mRNA in the MAC-T. **Journal of Dairy Research**, v. 77, p. 199-204, 2010.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro, Guanbara Koogan, 2006.

KELLEY, B. D.; CHIOU, T.-W.; ROSENBERG, M.; WANG, D. I. C. Industrial animal cell culture. In: REHM, H.-J.; REED. **Biotechnology**: a multi-volume comprehensive treatise, 2.ed. Weinheim: VCH Verlag, 1993, v. 3, p. 23-38.

KERR, D. E.; FURTH, P. A.; POWELL, A. M.; WALL, R. J. Expression of gene-gun injected plasmid DNA in the ovine mammary gland and in lymph nodes draining the injected site. **Animal Biotechnology**, v. 7, p. 33-45, 1996.

KITTRELL, F. S.; OBORN, C. J.; MEDINA, D. Development of mammary preneoplasias in vivo from mouse mammary epithelial cell line in vitro. **Cancer Research**, v. 52: p. 1924-1932, 1992.

KORHONEN, V. P.; TOLVANEN, M.; HYTTINEN, J. M.; UUSI-OUKARI, M.; SINERVIRTA, R.; ALHONEN, L.; JAUHIAINEN, M.; JANNE, O. A.; JANNE, J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 482-489, 1997.

KUHR, N. J. **Comparative aspect of lactation**. In: Peaker, M. (Ed.), Nova York: Academic Press, p. 165-192.

LADISCH, M. R. **Bioseparations engineering**: principles, practice and economics, 1. ed., New York: JohnWiley & Sons, 2001

LAKHOTIA, S.; BAUER, K. D.; PAPOUTSAKIS, E. T. Fluid-mechanical forces in agitates bioreactor reduce the CD13 and CD33 surface protein content of HL60 cells. **Biotechnology Bioengineering**, v. 41, n. 9, p. 868-877, 1993.

LAMMERS, A.; NUIJTEN, P. T. M.; KRUIJT, E.; STOCKHOFF-ZURWIEDEN, N.; CECHT, U.; SMITH, H. E.; ZIJDERCVELD, F. G. Cell Tropism of Staphylococcus aureus in bovine mammary gland cell culture. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 77-89, 1999.

LEE, E. K.; HUANG, L.; LEE, Y. H. Effect of liquid properties and flow on liquid films mass transfer coefficient in silicone membrane oxygenation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 36, p. 530-533, 1990.

LEE, E. Y.; LEE, W.; KAETZEL, C. S.; PARRY, G.; BISSELL, M. J. Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 82, p. 1419-1423, 1985.

MAINS, R. E.; CULLEN, E. I.; MAY, V.; EIPPER, B.A. The role of secretory granules in peptide biosynthesis. **Annals of New York Academy Science**, v. 493, p. 278-291, 1987.

MARTIN, R. J.; BALDWIN, R. L. Effects of insulin on isolated rat mammary cell metabolism: glucose utilization and metabolite patterns. **Endocrinology**, v. 89, p. 1263-1269, 2011.

MASSOUD, M.; ATTAL, J.; THEPOT, D.; POINTU, H.; STINNAKRE, M. G.; THERON, M. C.; LOPEZ, C.; HOUEBINE, L. M. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, p. 553–563, 1996.

MATITASHVILI, E.; BAUMAN, D. E. Culture of primary bovine mammary epithelial cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 35, n. 8, p. 431-434. 1999.

MATITASHVILI, E.; BRAMLEY, A. J.; ZAVIZION, B. Na in vivo approach to ruminant mammary gland biology. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 17-40, 1997.

MEDINA, D.; SMITH, G. H. In search of mammary gland stem cells. **Protoplasma**, v. 59, p. 77-84, 1990.

MELLADO, M. C. M. **Purificação de eritropoietina recombinante empregando membrana de afinidade**. 2005.115 f. Tese (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MIKUS, T.; MALY, P.; POPLSTEIN, M.; LANDA, V.; TREFIL, P.; LIDICKY, J. Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse. **Folia Biologica (Praha)**, v. 47, p. 187–195, 2001.

MIKUS, T.; POPLSTEIN, M.; SEDLAKOVA, J.; LANDA, V.; JENIKOVA, G.; TREFIL, P.; LIDICKY, J.; MALY, P. Generation and phenotypic analysis of a transgenic line of rabbits secreting active recombinant human erythropoietin in the milk. **Transgenic Research**, v. 13, p. 487–498, 2004.

MOLOWA, D. T.; MAZANET, R. The state of biopharmaceutical manufacturing. **Biotechnology Annual Review**, v. 9, p. 285-302, 2003.

MONTESINO, R.; TOLEDO, J. R. The mammary gland: bioreactor for the production of recombinant proteins. **Biotecnologia Aplicada**, v. 23, p. 279-286, 2006.

NEVILLE, M.C., MCFADDEN, FORSYTH, I. A. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Neoplasia**, v. 7, p. 49-66, 2002.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 291-317, 2003.

NOVIN, M. G, NOURI, M. Effect of Matrigel on function and morphology of human endometrial epithelial cell in vitro. **Iran Biomed Journal**, v. 11, n. 2, p. 87-94, 2007.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Methods in Molecular Biology**, v. 267, p. 15-52, 2004.

PANTSCHENKO, A. G.; BARBER, M. R.; WOODCOCK-MITCHELL, J.; BUSHMICH, S. L.; YANG, T. J. Establishment and characterization of a caprine mammary myoepithelial cell line (CMMyoC). **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 36, n. 6, p. 351-356, 2000.

PARK, J. K.; LEE, Y. K.; LEE, P.; CHUNG, H. J.; KIM, S.; LEE, H. G. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 362-371, 2006.

PETTERS, R.; BUYS, N.; ROBIJNS, E. L. Milk yield and milk composition of Flemish milksheep, Suffolk and Texel ewe and their crossbreeds. **Small Ruminant Research**, v. 7, p. 279-288, 1992.

POLLOCK, D. P.; KUTZKO, J. P.; BIRCK-WILSON, E.; WILLIAMS, J. L.; ECHELARD, Y.; MEAD, H. M. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 231, n. 1-2, p. 147-157, 1990.

QUELLE, F. W.; CASLAKE, L. F.; BURKERT, R.E.; WOJCHOWSKI, D. M. High-level expression and purification of recombinant human erythropoietin produced using a baculovirus vector, **Blood**, v. 74, n. 2, p. 652-657, 1989.

RODRIGUEZ, M. H.; ARNAUD, S.; BLANCHET, J. P. IL-11 directly stimulates murine and human erythroid burst formation in semisolid cultures. **Experimental Hematology**, v. 23, p. 545–550, 1995.

ROSE, M. T.; ASO, H.; YONEKURA, S.; KOMATSU, T.; HAGINO, A.; OZUTSUMI, K.; OBARA, Y. In vitro differentiation of cloned bovine mammary epithelial cell. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 345-355, 2002.

ROSSELLEY, C.D.; BISSEL, M.J. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bi-directional flow of information between cells and the extra-cellular matrix regulates mammary epithelial cell function, **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, p. 391-397; 1995.

RUDOLPH, M. C.; MCMANAMAN, J. L.; HUNTER, L.; PHANG, T.; NEVILLE, M.C. Functional development of the mammary gland: Use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during the pregnancy, lactation and involution, **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 8, p. 287-307, 2003.

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

RUNSWICK, S. K.; O'HARE, M. J.; JONES, L.; STREULI, C. H.; GARROD, D. R. Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 823-830, 2001.

SAMBANIS, A.; HU, W.-S. Cell culture bioreactors. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise**, 2. Ed. Weinheim: VCH Verlag, 1993, v. 3, p. 105-126.

SÁNCHEZ, O.; TOLEDO, J. R.; RODRIGUEZ, M. P.; CASTRO, F. O. Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the Milk of mice and goats. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 89-97, 2004.

SCHAGEN, F. H.; OSSEVOORT, M.; TOES, R. E.; HOEBEN, R. C. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. **Critical Reviews in Oncology /Hematology**, v. 50, p. 51-70, 2004.

SCHANBANCHER, F.L.; AMSTUTZ, M.D. Direct transfection of mammary gland: Opportunities for modification of mammary function and the production, composition and qualities of milk. In: WELCH RAS, BURNS DJW, DAVIS SR, POPAY AI, PROSSER C.G. (Ed.). **Milk composition, production, and**

biotechnology. New York: CAB International, 1997. p. 243-64(Biotechnology in Agriculture Series, n.18).

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

SEJRSEN, K.; PURUP, S. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 828-835, 1997.

SEJRSEN, K.; PURUP, S.; VESTERGAARD, M.; FOLDAGER, J. High body weight gain and reduce bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, p. 93-104, 2000.

SEKHRI, K. K.; PITELKA, D. R.; DEOME, K. B. Studies of mouse mammary glands. Cytomorphology of the normal mammary gland. **Journal of National Cancer Institute**, v. 39, p. 459-490, 1967.

SERVELY, J.-L.; EMANE, M. N.; HOUEBINE, L.-M.; DIJANE, J.; DELOUIS, C.; KELLY, P. A. Comparative measurement of the lactogenic activity of ovine placental lactogen in rabbit and ewe mammary gland, **General and Comparative Endocrinology**, v. 51, p. 255-262, 1983.

SHAY, J. W.; TOMLINSON, G.; PIATYZEK, M. A.; GOLLAHON, L. S. Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 425-432, 1995.

SIMMONS, L.C.; YANSURA, D.G. Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in Escherichia coli. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 629-634, 1996.

SIMONS, J. P.; WILMUT, I.; CLARCK, A. J. Gene transfer in sheep. **Biotechnology**, v. 6, p. 179-183, 1998.

SIMOS, E. N.; NIKOLAIOUS, E. M.; ZOIPOULOS, P. E. Yield, composition and certain physicochemical characteristics of milk of the Epirus mountain sheep breed. **Small Ruminant Research**, v. 20, p. 67-74, 1996.

SMALLEY, M. J.; TITLEY, J.; PATERSON, H.; PERUSINGUE, N.; CLARKE, C. Differentiation of separated mouse mammary luminal epithelial and myoepithelial

cells culture on EHS matrix analyzed by indirect immunofluorescence of cytoskeletal antigens. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 12, p. 513-524, 1999.

SOBOLEV, A. S.; ROSENKRANZ, A. A.; SMIRNOVA, O. A.; NIKITIN, V. A.; NEUGODOVA, G. L.; NARODITSKY, B. S.; SHILOV, I. N.; SHATSKI I. N.; ERNST, L. K. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 7928-33, 1998.

SPANAMBERG, A.; WÜNDER, E. A.; PEREIRA, D. I. B.; ARGENTA, J.; SANCHES, E. M. C.; VALENTE, P.; FERREIRO, L. Diversity of yeasts from bovine mastitis in southern Brazil, **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 144-156, 2008.

STAMPFER, M.; HALLOWES, R. C.; HACKETT, A. J. Growth of normal human mammary cell culture. **In Vitro**, v. 16, n. 5, p. 415-425, 1980.

STREULI, C. H. Extracellular matrix and gene expression in mammary epithelium. **Seminars Cell Biology**, v. 4, p. 203-212, 1993.

SUN, Y. L.; LI, C. S.; CHOU, Y. C. Establishment and characterization of spontaneously immortalized porcine mammary epithelial cell line. **Cell Biology International**, v. 30, p. 970-976, 2006.

TALHOUK, R. S.; NEISWANDER, R. L.; SCHNBACHER, F. L. In vitro culture of cryopreserved bovine mammary cells on collagen gels: synthesis and secretion of casein and lactoferrin. **Tissue Cell**, v. 22, p. 583-599, 1990.

TOLEDO, J. R.; SANCHEZ, O.; SEGUI, R. M.; GARCIA, G.; MONTANEZ, M.; ZAMORA, P. A.; RODRIGUEZ, M. P.; CREMATA, J. A. High expression of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 225-235, 2005.

TOLMAN, B.; MCKUSICK, B. C. The effect of growth rate on mammary gland development in ewe lambs: a review. In: GREAT DAIRY SHEEP SYMPOSIUM, 7. 2001, Eau Claire. **Proceedings...** Winsconsin: Department of Animal Sciences, University of Wisconsin, Madison, 2001. p. 143-155.

TONSO, A. **Monitoramento e operação de cultivos de células animais em sistemas de perfusão**. 2000. 136 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TUCKER, H. A. Hormones, mammary growth, and lactation: A 41-year perspective. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 874-884, 2000.

UUSI-OUKARI, M.; HYTTINEN, J. M.; KORHONEN, V. P.; VASTI, A.; ALHONEN, L.; JANNE, O. A.; JANNE, J. Bovine alpha casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. **Transgenic Research**, v. 6, p. 75–84, 1997.

VRIEZEN, N.; ROMEIN, B.; LUYBEN, K. C. A. M.; DIJKEN, J. P. Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. **Biotechnology. Bioengineering**, v. 54, n.3, p. 272-286, 1997.

WAKAO, H.; GOUILLEUX, F.; GRONER, B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. **EMBO Journal**, v. 7, p. 2182-2191, 1994.

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

WALSH, G. **Biopharmaceuticals**: biochemistry and biotechnology, 1.ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1999.

WANG, R.; VADLAMUDI, R. K.; BAGHERI-YARMAND, R.; BEUVINK, I.; HYNES, N. E. Essential functions of p21-activated kinase 1 in morphogenesis and differentiation of mammary glands, **The Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 3, p. 583-590, 2003.

WEAVER, V.; LELIEVRE, S.; LAKINS, J.; CHRENEK, M.; JONES, J.; GIACONTTI, F.; WERB, Z.; BISSELL, M. $\beta 4$ Integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. **Cancer Cell**, v. 2, p. 205-216, 2002.

WELLNITZ, O.; KERR, D. E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, p. 191-202, 2004.

WERNER, R. G.; NOE, W.; KOPP, K.; SCHLUTER, M. Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. **Arzneimittelforschung**, v. 48, p. 870-880, 1998.

WHEELER, M. B. Production of transgenic livestock: promise fulfilled. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 32-37, 2003.

WHEELER, T. T.; CALLAGHAN, M. R.; DAVIS, S. R. M. Milk protein synthesis, gene expression, and hormonal responsiveness in primary cultures of mammary cells from lacting sheep. **Experimental Cell Research**, v. 217, p. 346-354, 1995.

WHITELAW, C. B. A. Regulation of ovine b-lactoglobulin gene expression during the first stage of lactation, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 209, p. 1089-1093, 1995

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 3-8, 2007.

WINDER, S. J.; TURVEY, A.; FORSYTH, I.A. Stimulation of DNA synthesis in cultures of ovine mammary epithelial cell by insulin and insulin like-growth factors. **Journal of Endocrinology**, v. 123, p. 319-326, 1989.

WOLFE, R. A. Media for cell culture. In: REHM, H.-J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise**, 2. ed., Weinheim: VCH Verlag, 1993, v. 3, p. 141-156.

WU, J.; GOSSEN, M. F. A. Investigation of air-liquid interfacial damage of animal cells in a falling film-flow device. **Biotechnology Technology**, v. 8, p. 111-116, 1994.

WU, H. T., LIN, C. S., HUANG, M. C. In vitro and ex vivo green fluorescent protein expression in alveolar mammary epithelial cells and mammary glands driven by distal 5'-regulative sequence and intron 1 of the goat b-casein gene. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 231-239, 2003.

YANG, J.; BALAKRISHNAN, A.; HAMAMOTO, S.; ELIAS, J. J.; ROSENAU, W.; BEATTIE, C. W.; DASGUPTA, T. K.; WELLINGS, S. R; NANDI, S. Human breast epithelial cells in serum-free collagen gel primary culture: Growth, morphological and immunocytochemical analysis. **Journal of Cell Physiology**, v. 133, p. 228-234, 1987.

YANG, J.; TSUKAMOTO, T.; POPNIKOLOV, N.; GUZMAN, R.C.; CHEN, X.; YANG, J. H.; NANDI, S. Adenoviral-mediated gene transfer into primary human and mouse mammary epithelial cells in vitro and in vivo. **Cancer Letter**, v. 98, p. 09-17, 1995.

ZAVIZION, B.; VAN DUFFELEN, M.; SCHAEFFER, W.; POLITIS, I. Establishment and characterization of mammary epithelial cell line with unique properties. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 32, p. 138-148, 1996.

ZENG, X. F., RUCKENSTEIN, E. Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption, **Journal of Membrane Science**, v. 117, n. 1-2, p. 271-278, 1996.

ZHAO, Chenfu; MENG, Lu; HU, Hongyu; WANG, Xudong; SHI, Fangyu; WANG, Yajuan; LI, Qianqian; LIN, Aixing. Spontaneously immortalized bovine mammary epithelial cells exhibit a distinct gene expression pattern from the breast cancer cells. **BioMed Central Cell Biology**, v. 11, p. 82, 2010.

ZHOU, Y.; AKERS, R.M.; JIANG, H. Growth hormone can induce expression of ofur major milk protein genes in transfected MAC-T cells. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 100-108, 2008..

APENDICE A – PADRONIZAÇÃO DO RT-PCR EM TEMPO REAL

A padronização do PCR em tempo real foi realizada com cDNA extraído de explantes de glândula mamária de ovelha em lactação. Foram realizados vários testes com concentrações e temperatura de anelamento de oligonucleotídeos iniciadores para os diferentes genes: β -globulina, α -caseína, β -caseína, κ -caseína, GAPDH.

O cDNA da glândula mamária em lactação foi extraído utilizado kit comercial Illustra RNAspin mini (GE Healthcare®, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA) e analisadas suas absorbâncias. A síntese do cDNA foi realizada com o Kit comercial SuperScript® First Strand (Invitrogen®), com 1 μ g de RNA por reação.

Inicialmente foram testadas as temperaturas de 58°C e 60 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos, utilizando 2.000ng de cDNA por reação. A temperatura de 60 °C foi a mais indicada quando se avaliou o perfil da curva de quantificação e pico formado pela curva de dissociação. Foram avaliadas diferentes combinações de concentrações de oligonucleotídeos “forward” e “reverse” (100 μ M vs 100 μ M, 100 μ M vs 400 μ M, 400 μ M vs 100 μ M; 100 μ M VS 800 μ M, 800 μ M vs 100 μ M, 400 μ M vs 400 μ M, 400 μ M vs 800 μ M, 800 μ M vs 800 μ M e 800 μ M vs 800 μ M) para os genes que não mostraram bons resultados com a concentração inicial 800 μ M para ambos oligonucleotídeos. A concentração de 800 μ M para ambos oligonucleotídeos para todos os genes apresentaram melhor resultado, menos para o gene da β -actina que apresentou melhores resultados com 400 μ M para ambos oligonucleotídeos (Gráfico 5).

Após a conclusão do PCR com a concentração de 800 μ M para cada oligonucleotídeo foi realizada eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 15%, corando o gel com prata (Figura 11). Assim se verificou a amplificação de apenas um fragmento por amostra com o peso molecular esperado.

Gráfico 5 - Curva da expressão (A) e de dissociação (B) para os genes β -globulina, α -caseína, β -caseína, κ -caseína, GAPDH. Em cada reação foi utilizado 800mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 μ g de cDNA de glândula mamária de ovelha lactante - São Paulo – 2010

Figura 11 - Imagem representativa do gel de poliacrilamida 15% sobre transluminador. Em cada amostra foram utilizados 10 μ l do produto do RT-PCR. A) β -globulina (100pb); B) α -caseína (301pb); C) β -caseína (106pb); D) κ -caseína (249pb); E) GAPDH (76pb) - São Paulo – 2010

APÊNDICE B – CURVAS DE EFICIÊNCIA PARA OS GENES: β -lactoglobulina, α -CASEÍNA, β -CASEÍNA, κ -CASEÍNA E GAPDH.

Para a confecção das curvas de eficiência foram utilizadas 5 pontos em triplicata para diluições de base 10. O cDNA de glândula mamária em lactação foi extraído com o kit comercial Illustra RNAspin mini (GE Healthcare®, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA) e analisadas suas absorbâncias. A síntese do cDNA foi realizada com o Kit comercial SuperScript® First Strand (Invitrogen®), com 1 μ g de RNA por reação.

Para cada reação: 0,4 μ l de cDNA, 5 μ l de SyberGreenER™ qPCR Supermix Universal (Invitrogen®), 800 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (2 μ l) e 3 μ l de água ultra-pura (Sigma®). Para cada gene foi realizada a reação com um controle negativo (todos os reagentes presentes na reação, sendo o volume relativo ao cDNA substituído por água ultra-pura). As reações foram submetidas às seguintes condições, utilizando o equipamento Realplex² Mastercycle ep Gradient S (Eppendorf®): 50°C por 2min, 95°C por 10 min., 95°C por 15seg, 60°C por 15 seg. e 68°C por 20seg. As últimas três etapas foram repetidas 45 vezes. Em seguida as amostras foram novamente aquecidas a 95°C por 15seg e resfriadas a 60°C por 15seg, quando realizou a curva de dissociação (de 95°C para 60°C em 20min.), utilizando o sistema de detecção Mastercycle ep Realplex® (Eppendorf®).

Nos gráficos 6 a 11 estão demonstradas as curvas de eficiência e de dissociação para cada gene analisado.

Gráfico 6 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da α -caseína - São Paulo – 2010

A **B**

Gráfico 7 - Curvas de eficiência (A), de dissociação (B) para o gene da β -caseína- São Paulo – 2010

Gráfico 8 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da κ -caseína - São Paulo – 2010

Gráfico 9 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da β -lactoglobulina - São Paulo – 2010

Gráfico 10 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da GAPDH - São Paulo – 2010

Gráfico 11 - Curvas de eficiência (A) e de dissociação (B) para o gene da β -actina - São Paulo – 2010

APÊNDICE C – PADRONIZAÇÃO DO WESTERN-BLOTTING PARA DETECÇÃO DE EPOrh NO LEITE DE OVINOS

Vários fatores devem ser considerados para a padronização do Western-Blotting. O primeiro fator padronizado foi a amperagem e a voltagem necessárias para a transferência das proteínas do gel para a membrana de polivinil, utilizando 120V e 400mA. Com esse padrão, verificou-se pela coloração de Ponceu-S que as proteínas passaram para a membrana e com a coloração “Comassie Blue” (Anexo D.E) que as proteínas saíram do gel. Nesse caso, realizou-se a transferência com uma membrana de polivinil dupla, não sendo possível verificar a presença de proteínas na segunda membrana.

O segundo fator a ser considerado é as diferentes formas de bloqueio da membrana. Foi avaliado para o bloqueio duas soluções: 1) solução basal (Anexo 4.D) com 1% de BSA e 10% de leite desnatado em pó e 2) solução basal com 1,5% de gelatina (Sigma®). O bloqueio ocorreu com os dois métodos com duração de 5h e também “overnight”. O bloqueio funcionou apenas para a solução com leite, não sendo visualizada nenhuma diferença entre os tempos.

O terceiro fator padronizado foi a diluição de anticorpo primário e o seu tempo de incubação. Foram testadas duas diluições (1:500 e 1:1000) com os tempos de incubação de 5h ou “overnight”. Os melhores resultados foram observados com a diluição 1:500 e incubação “overnight”. O mesmo procedimento foi realizado para o anticorpo secundário, mas com as diluições de 1:5.000 e 1:10.000. A melhor visualização foi observada com a primeira diluição, não havendo diferenças entre os tempos de incubação.

Sendo estabelecidos o bloqueio com solução com leite por 5h, incubação com o anticorpo primário “overnight” na diluição 1:500 e a diluição de 1:5000 do anticorpo secundário por 5h, foi possível verificar o limiar de detecção do teste. Para isso foram utilizadas doses decrescentes de Eritromax (20µl, 10µl, 5µl, 2,5µl, 1,25µl e 0,75µl). Outro teste realizado de forma simultânea utilizou as mesmas diluições de Eritromax, mas em leite de ovelha normal. Para todas as amostras foi utilizado volume final de 30µl, sendo 10µl composto de tampão da amostra (líquido de Laemmli – Anexo D.A) Foi possível observar até 0,75µl de Eritromax (aproximadamente 0,0675ng de EPOh) (Figura 12)

O segundo teste foi verificar se ocorreriam ligações inespecíficas do anticorpo secundário. Assim uma membrana com diferentes amostras de leite e ovelha foi incubada apenas com o anticorpo secundário e revelada. Não foi possível observar nenhuma reação inespecífica.

Figura 12 - Imagem representativa de Western-Blotting com diferentes diluições de Eritromax® (EPOrh) em filme de raio-x. 1) 20µl; 2) 10µl; 3) 5µl; 4) 2,5µl; 5) 1,25µl e 6) 0,75µl. A) Diluições de Eritromax® em tampão da amostra; B) Diluições em leite de ovelha normal - São Paulo – 2010

ANEXOS

Anexo A - Cultivo celular

Anexo A.A - Solução de PBS sem Cálcio e Magnésio (pH7,0)

Composição	Quantidade
NaCl	10mg/ml
KCl	0,25mg/ml
NaPO ₄ 12H ₂ O	1,44mg/ml
NaPO ₄	0,25mg/ml

Anexo A.B - Meio de cultivo I

Composição	Quantidade
DMEM	90%
SFB	10%
GENTAMICINA	50µg/ml
PENICILINA E ESTREPTOMICINA	10µl/ml
AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS	5µl/ml
FUNGIZONE	5µl/ml

Anexo A.C - Solução de Tripsina

Composição	Quantidade
TRIPSINA (1:250 – Gibco)	1%
EDTA (1mM)	0,29mg/ml
* em PBS sem Cálcio e Magnésio	

Anexo A.D - Meio de Congelação

Composição	Quantidade
DMEM	70%
SFB	20%
DMSO	10%
GENTAMICINA	10µl/ml

Anexo A.E - Meio de cultivo com Soro de Ovelha lactante (SOL)

Composição	Quantidade
DMEM	90%
SOL INATIVADO*	10%
GENTAMICINA	50µg/ml
PENICILINA E ESTREPTOMICINA	10µl/ml
AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS	5µl/ml
FUNGIZONE	5µl/ml

*O SOL foi constituído por um pool de soro de ovelhas em diferentes períodos de lactação (dia do parto, 15º dia, 30º dia e 45º dia de lactação). Todos os soros foram inativados pelo aquecimento a 56°C por 1h seguida por 4°C “overnight”. O pool de soro foi filtrado com filtro de 0,22µm e armazenado a -20°C até a avaliação.

ANEXO B – IMUNOCITOQUÍMICA**Anexo B.A – Solução de Bloqueio**

Anexo 1.I - Composição	Quantidade
PBS	90%
ALBUMINA SÉRICA BOVINA	1%
SORO DE OVELHA INATIVADO	10%

ANEXO C – SELEÇÃO E CLONAGEM PLASMIDEAL**Anexo C.A – Tampão TE (10mM Tris / 1mM EDTA)**

Composição	Quantidade
Tris-HCl 2M	5µl/ml
Tris-HCl 2M	2µl/ml
*em água milli-Q e ajustar o pH para 7,2-7,4

ANEXO D –WESTERN-BLOTTING

Anexo D.A – Líquido de Laemmli

Composição	Quantidade
TRIS-CL 1.5 M PH 6.8	20%
GLICEROL	50%
B-MERCAPTOETANOL	25%
SDS	0,1g/ml
BROMOFENOL BLUE	5%

TRIS-CL 1.5M pH 6.8

Composição	Quantidade
TRIS BASE	18%
ÁGUA BIDESEILADA	70%
HCL CONCENTRADO (37.2% -12.1M)	12%

*Anexo D.B – Gel de Poliacrilamida**Gel de separação (4,5%)*

Composição	Quantidade
ÁGUA BIDESEILADA	22,66%
MIX POLIACRILAMIDA	50%
TRIS 1,5 M (Ph 8,8)	25,33%
SDS 10%	1%
PERSULFATO DE AMÔNIO	1%l
TEMED	0,04%

Gel de Corrida (15%)

Composição	Quantidade
ÁGUA BIDESEILADA	62,65%
MIX POLIACRILAMIDA	19,26%
TRIS 1 M (Ph 6,8)	14,62%
SDS 10%	1,15%
PERSULFATO DE AMÔNIO	1,15%
TEMED	1,15%

Mix Poliacrilamida

Composição	Quantidade
ACRILAMIDA	30%
BISACRILAMIDA	1%

* em água bidestilada

Anexo D.C - Tampão de transferência

Composição	Quantidade
TRIS BASE	3,025%
GLICINA	14,41%
SDS	0,2%

* Em Água bidestilada

Anexo D.D – Solução Basal

Composição	Quantidade
NACI 2,5M	6%
TRIS HCl 1M PH7,4	1%
TWEEN 20 25%	0,2%

* Em Água bidestilada

Anexo D.E – Commasie Blue

Composição	Quantidade
COMMASSIE BLUE R350	1mg/ml
METANOL	20%
ÁCIDO ACÉTICO	10%
H ₂ Odd	70%