

CAMILLA MOTA MENDES

Produção de eritropoietina recombinante humana no
leite de camundongas transgênicas

São Paulo

2009

CAMILLA MOTA MENDES

**Produção de eritropoietina recombinante humana no
leite de camundongas transgênicas**

Tese 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 Doutora em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo

2009

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.2114
FMVZ

Mendes, Camilla Mota

Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongos transgênicos / Camilla Mota Mendes. – São Paulo : C. M. Mendes, 2009.
49 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2009.

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

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

1. Transgênicos. 2. Camundongos. 3. Eritropoietina.
4. Humana. 5. Leite. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção da eritropoietina humana recombinante no leite de camundongos", protocolo nº692/2005, utilizando 150 camundongos, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Production of human recombinant erythropoietin in mice milk", protocol number 692/2005, utilizing 150 mice, under the responsibility of Prof. Dr. José Antonio Visintin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 08 de julho de 2005

Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera 
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MENDES, Camilla Mota

Título: Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongas transgênicas

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Às mulheres da minha vida Célia e Laura...

... e aos homens da minha vida, Reginaldo e Bruno.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Célia, meu exemplo, minha paixão. Quem me ensinou a lutar pelas coisas que queremos, não importando quão difícil ou longe esteja, não passando por cima de ninguém, só fazendo sua parte. Obrigada por ser minha mãe, meu pai, minha amiga, que sozinha conseguiu me dar estrutura emocional e financeira. Muitos acham nosso relacionamento estranho, pois até hoje nos falamos muitas vezes por dia, mas isso só é consequência da nossa história, do nosso vínculo. Me orgulho muito de você.

Ao Reginaldo, pelo apoio incondicional, pelo companheirismo e amor. Por ser minha válvula de escape, me tirando do mundinho do trabalho e que me proporcionou a vinda da Laura, minha nenê, que mudou meu mundo. Aos poucos está fazendo eu me organizar, porque tem hora de buscar na escolinha e agora não dá mais pra deixar na cadeirinha quietinha enquanto trabalho, como foi dos quinze dias aos quatro meses.

Ao meu irmão Bruno, que apesar de todas as brigas nos amamos muito, no fundo é que mesmo com pais diferentes somos muito parecidos e geniosos. E a todos da minha grande família maluca, que me ajudou a ser o que sou.

Ao Visintin, pela oportunidade, exemplo, apoio e dedicação nas horas mais fáceis, como nas viagens e nas mais difíceis, quando se tem que qualificar no dia seguinte. Você é mais que um orientador, é um pai pra todos nós. Nestes 8 anos de laboratório mudei completamente, entrei uma adolescente e hoje sou uma mulher, mas ainda imatura em alguns pontos. Não sei nem como te agradecer por tudo.

À Mayra, amiga, mãe, conselheira, que é tão parecida comigo em alguns pontos e tão diferente em outros. Sempre pronta para escutar e para puxar a orelha delicadamente. Obrigada pelos meninos,

Aos colegas do laboratório do passado, Alê, Heloísa, Viviane, Marco, Marcelo ou do presente, Weber, Renata, Mariana, Paulo, Maran, Flávia, Zeca, Fabíola, Marcella e Pedro. E também para as minhas filhinhas Mariana e Fernanda. Sempre brinquei que somos uma grande família, podemos brigar entre nós, mas aí se alguém de fora fala um aí.

À Beth Martins do Butantan, que acolheu de braços abertos alguém que apareceu de repente no seu laboratório, apoiando com seu grande conhecimento numa área desconhecida pra nós.

Às meninas do Butantan, Érika, Luana, Tati, Dani, Patt, Roberta. Vocês são muito especiais, obrigada pelo apoio incondicional e pelo carinho.

À Camila e ao Marcílio, pelas palhaçadas. Cadê a Tatazinha. Um beijo pras meninas, Cris, Liege, Gi e Jaque.

Gostaria de agradecer a todos, do fundo do coração que ajudaram na execução deste trabalho e na minha formação. Direta ou indiretamente, desde um sorriso ou um abraço num momento triste, passando pelos momentos bons como Pira ou nos churrascos e quem olhou a Laurinha por uns minutinhos enquanto eu trabalhava.

Aos colegas, docentes e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, pelos momentos tão agradáveis nesse tempo todo.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“[...] acho que só há um caminho para a ciência — ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonarmo-nos por ele; casarmo-nos com ele, até que a morte nos separe — a não ser que obtenhamos uma solução. Mas ainda que encontremos uma solução, poderemos descobrir, para nossa satisfação, a existência de toda uma família de encantadores, se bem que talvez difíceis, problemas-filhos, para cujo bem-estar poderemos trabalhar, com uma finalidade em vista, até ao fim dos nossos dias” (POPPER, K. R.)

RESUMO

MENDES, C. M. **Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongas transgênicas** [Production of recombinant human erythropoietin in transgenic mice milk]. 2009. 49 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Proteínas recombinantes simples, como a insulina e o hormônio de crescimento humano, podem ser produzidas em microorganismos como bactérias. Entretanto, para a produção de proteínas que precisam de modificações pós-traducionais, que não se consegue em microorganismos, torna-se importante o uso de biorreatores com culturas de células eucarióticas. Este sistema de produção é caro e a quantidade de proteína produzida é pequena. Como alternativa surgiu o uso de animais transgênicos para reduzir os custos de produção. A Eritropoietina humana é uma proteína glicosilada e representa um dos maiores gastos para tratamento de doenças humanas. Já foi produzida em camundongos, coelhos e suínos transgênicos, com problemas na glicosilação ou alteração da higidez do animal pela falha da região promotora do vetor de transgene em limitar a expressão para a glândula mamária. Este estudo teve como objetivo a produção de (rhEPO) no leite de camundongas transgênicas sob ação de dois diferentes vetores, nunca utilizados na sua produção. Os vetores com os promotores da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina bovinos tiveram o gene da eritropoietina humana inserido entre as regiões promotora e codificadora do leite, num processo trabalhoso e pouco eficiente. Não foi possível inserir os vetores nas células tronco-embrionárias (CTE) de camundongos (USP-1) por eletroporação, mas as condições (390V por 80µs) foram testadas com vetor de fluorescência. Futuramente as CTE transgênicas serão agregadas aos embriões colhidos de camundongas superovuladas e após 24 horas de cultivo *in vitro* serão transferidos para camundongas pseudo-gestantes. Os animais nascidos (quimeras) serão acasalados e seus descendentes terão o DNA analisado para verificar a presença do gene da eritropoietina humana. Os animais positivos (fundadores) serão acasalados e as fêmeas positivas nascidas serão acompanhadas quanto à produção da eritropoietina humana no leite. Será purificada do leite, quantificada e avaliada quanto a glicosilação por Western Blotting.

Palavras-chave: Transgênicos. Camundongos. Eritropoietina. Humana. Leite.

ABSTRACT

MENDES, C. M. Production of recombinant human erythropoietin in transgenic mice Milk [Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongas transgênicas] 2009. 49 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Recombinant proteins such as insulin and human growth hormone can be produced by microorganisms. Although, to produce proteins that need post-translational modifications that can not be done by microorganisms, and a eucariotic cell bioreactor is needed. This production system is expensive and the amount of protein produced is low. As an alternative, the transgenic animal technology came up to reduce production fees. The human erythropoietin is a glycosylated protein and it is one of the most expensive to human treatment. It was already produced in transgenic mice, rabbit and swine but with glycosylation problems or health alterations by transgene vector's promoter region failure that limits the expression on mammary gland. This study aimed to produce recombinant human erythropoietin (rhEPO) in transgenic mice milk by two different vectors, never had been used to produce it before. Vectors with bovine alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin promoters had the human erythropoietin gene inserted between promoter and milk coding regions by a hard working and low efficiency technique. It was not possible to insert our vectors on mice embryonic stem cells (ESC) (USP-1) by electroporation but its conditions (390V, 80µs) were tested with fluorescent vector. In the future, transgenic ESC will be aggregated into mice embryos and after 24 hours of *in vitro* culture will be transferred to pseudo-pregnant mice. The new borns (chimera) will be mated and its offspring will have their DNA evaluated to verify the human erythropoietin gene occurrence. The founder animals will be also mated and the positive female borned will be evaluated for human erythropoietin production on milk. It will be purified, quantified and evaluated for glycosylation by western blotting technique.

Keywords: Transgenesis. Mice. Erythropoietin. Human. Milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do vetor alfa-lac	29
Figura 2 – Desenho esquemático do vetor BGL.....	30
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 0,8%	36
Figura 4 – Colônias da linhagem USP1 na 19ª passagem, submetidas a eletroporação. ...	37
Figura 5 – Produção de camundongas transgênicas.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPO	Eritropoietina
EPOh	Eritropoietina humana
EPOrh	Eritropoietina recombinante humana
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CTE	Células-tronco embrionárias
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECG	Gonadotrofina Coriônica Equina
GH	<i>Hormônio de Crescimento</i>
GMEM	<i>Glasgow Modified Eagle Media</i>
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
LIF	Fator inibidor da leucemia
MCI	Massa Celular Interna
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
UI	Unidade Internacional
UTR	Região não Traduzida
WAP	Whey Acid Protein

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
aa	Aminoácidos
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
®	Marca Registrada
μ	Micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 TÉCNICAS DE TRANSGENIA	19
2.2 ESTRUTURA DOS VETORES.....	20
2.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	21
2.4 ERITROPOIETINA	22
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	25
3.1 HIPÓTESE	25
3.2 OBJETIVOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR ALFA-LACTALBUMINA.....	27
4.1.1 Extração de DNA	27
4.1.2 PCRs e Clonagens em vetores plasmidiais	28
4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR BGL	29
4.2.1 PCR e Clonagem	30
4.3 CULTURA DE CTE MURINAS	30
4.3.1 Obtenção de fibroblastos fetais de camundongos (MEF).....	31
4.3.2 Cultura de células tronco-embrionárias.....	31
4.3.3 Eletroporação das CTE	32
4.4 PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS	33
4.4.1 Padronização da técnica de agregação de quimeras	33
5 RESULTADOS	35
5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR ALFA-LACTALBUMINA.....	35
5.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR BGL	36
5.3 CULTURA E ELETROPORAÇÃO DAS CTE	37
5.4 PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS	37
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A produção de biofármacos protéicos por microorganismos geneticamente modificados, como bactérias ou leveduras foi estabelecida como um processo barato e inócuo para proteínas recombinantes, como a insulina e o hormônio de crescimento. Entretanto, para proteínas que precisam de modificações pós-traducionais, como glicosilação, este sistema é falho, pois a atividade biológica é baixa. Como alternativa surgiram os sistemas de produção em cultura de células eucarióticas, que são capazes de produzir proteínas com corretas motificações pós traducionais, mas o rendimento é baixo e o custo elevado. Como outra alternativa foram desenvolvidos animais geneticamente modificados (transgênicos), capazes de produzir proteínas recombinantes em seus tecidos e seus fluídos, sendo a glândula mamária o principal tecido alvo. Isolando as proteínas do leite de animais livres de patógenos, elimina-se a possibilidade de contaminação e aumenta-se a quantidade do produto. Dentre as várias proteínas humanas utilizadas como biofármacos, a eritropoietina (EPO) é uma das mais importantes. A EPO é um hormônio glicoprotéico ácido que está envolvido no processo de diferenciação de células progenitoras de eritrócitos na medula óssea vermelha, sendo produzida pelo rim sob diferentes estímulos como hipóxia ou anóxia. A EPO ativa dos humanos (hEPO) é uma proteína simples composta de 165 aminoácidos com três a quatro sítios de glicosilação. Desde a purificação em 1977, vem sendo utilizada para propósitos terapêuticos como o tratamento de falência renal que culmina com um quadro de anemia. Como bactérias e leveduras não possuem enzimas adequadas para glicosilação, vários sistemas de bioreatores vêm sendo testados para a síntese de, como o cultivo *in vitro* de células de ovários de Hamster Chinês (CHO) e células de rim de filhotes de hamster (BHK). No entanto, as formas farmacêuticas de rhEPO produzidas nos dois cultivos apresentam diferentes modificações pós-transducionais quando comparadas com hEPO (um resíduo de ácido siálico na estrutura oligossacarídica da recombinante a torna mais ácida que a hEPO sérica). Estas rhEPO apresentam a glicosilação necessária para funções terapêuticas, mas como o resíduo siálico tem meia vida curta e é rapidamente metabolizada pelo fígado. A meia vida curta faz com que o tratamento necessite de mais aplicações, que têm alto

custo de produção. Em 2007, estimou-se o faturamento com a produção de proteínas de uso terapêutico da ordem de 47.2 bilhões de dólares, sendo aproximadamente 12 bilhões com a rhEPO. Segundo o Ministério da Saúde, o Governo teve em 2006 gastos de R\$ 4,2 bilhões na compra de medicamentos, sendo 500 milhões investidos na importação da EPO e de um interferon (11% do orçamento da saúde). O medicamento Epgen (Amgien, Sankio), uma das formas comerciais da rhEPO, gerou vendas globais de U\$ 5,7 bilhões no ano de 2001. Inúmeras proteínas já foram expressas na glândula mamária de animais transgênicos, sendo a hEPO expressa em camundongos, coelhos e suínos transgênicos, apresentando a correta glicosilação somente em suínos. O objetivo deste trabalho foi testar dois diferentes vetores de expressão em camundongos, para futuramente produzir bovinos transgênicos capazes de sintetizar grandes quantidades de rhEPO, seguindo o exemplo do GH humano, que já foi expresso na glândula mamária de bovinos e estimado que vinte animais seriam suficientes para suprir toda a demanda mundial deste hormônio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A transgenia é uma ferramenta usada na ciência básica para o estudo de mecanismos de expressão e função gênica. Na biotecnologia ela permite estudar doenças humanas, desenvolver o xenotransplante, produzir proteínas de uso farmacêutico e melhorar a eficiência da produção animal. Os animais transgênicos possuem DNA exógeno associado estavelmente ao genoma e são capazes de transmitir a característica de interesse para a progênie (WEELER, 2003; HOUDEBINE, 2005).

Um dos primeiros experimentos foi conduzido em camundongos por Gordon et al. (1980). Desde então, centenas de experimentos foram realizados em diferentes espécies, como ratos, coelhos, cabras, ovelhas, porcos e bovinos.

2.1 TÉCNICAS DE TRANSGENIA

Para a produção de animais transgênicos existem três metodologias principais: microinjeção de DNA em pronúcleo de zigotos, produção de quimeras por modificação de células tronco-embrionárias e, mais recentemente, a transferência nuclear (GORDON, 1980; MCCREATH et al, 2000; SUKAOKAR, 2000; MAGA, 2001; KEEFER, 2004). As duas primeiras são largamente utilizadas em animais de laboratório. Nestas técnicas obtêm-se animais com mosaïcismo (quimeras), ou seja, algumas células do animal possuem o transgene e outras não. Sendo assim, para conseguir animais homozigotos ou mesmo heterozigotos para o gene de interesse é preciso fazer uma série de cruzamentos, que são baratos e rápidos para animais de laboratório, mas demorados e custosos para animais de produção. Além disso, na microinjeção em pronúcleo, a integração do transgene no genoma é randômica, uma desvantagem quando comparada com as quimeras geradas pelo uso das CTE, no qual as posições de integração podem ser testadas previamente em laboratório. Entretanto, em animais, células tronco-embrionárias só foram estabelecidas com

sucesso em camundongos, restringindo a técnica a esta espécie (HODGES, STICE, 2001; KEEFER, 2004).

A transferência nuclear é uma técnica trabalhosa e cara, mas apresenta vantagens, pois se pode testar a estrutura e a expressão do transgene nas células, por técnicas de biologia molecular, antes da transferência nuclear ou antes da transferência do embrião para a receptora. Isso é importante para animais com gestação longa como 9 meses para bovinos ou 5 meses para caprinos e ovinos (WHEELER, 2003). No entanto, as etapas envolvidas no processo de produção desses animais permanecem incompreendidas, tornando difícil a otimização dos protocolos. Além disso, a fisiologia da gestação de animais clonados e transgênicos não está bem caracterizada, resultando em reduzido número de gestações a termo quando comparados com animais produzidos por fecundação *in vitro* (NIEMANN et al., 2003).

2.2 ESTRUTURA DOS VETORES

Para a produção dos animais transgênicos é necessário um vetor que contenha uma sequência de DNA, chamada vetor. Para obter uma eficiente expressão do transgene, o vetor deve conter uma região promotora, uma região correspondente à proteína de interesse e uma região codificadora.

O promotor contém elementos regulatórios, ou seja, sequências de DNA as quais o maquinário das enzimas de expressão gênica precisam reconhecer e se ligar para iniciar a síntese do RNAm. Em um vetor, o promotor pode ser constitutivo, o que levará a expressão para todos os tecidos do animal ou pode ser tecido-específico, dirigindo a expressão para um tecido alvo, como leite, urina, sêmen, sangue, entre outros.

Outro elemento importante é a sequência de DNA correspondente à proteína de interesse. Ela pode ser de cDNA ou de gDNA, entretanto transgenes tem baixa expressão na ausência de introns. O ideal é ter pelo menos um, de preferência antes do cDNA. A importância se deve pela presença de sítios de ligação de fatores

de transcrição, o que contribui para manter a cromatina aberta e ativa em volta do “Cap”, o que protege da ação de nucleases e fosfatases e assim dão mais estabilidade ao DNA. Além disso favorece o transporte do RNAm para o citoplasma. Também é responsável pelo correto splicing ou remoção dos introns, que é necessário para a formação do RNAm maduro. A região 5’ UTR da sequência de DNA que formará o RNAm permite melhor eficiência da translação e a região 3’ UTR as vezes contem sequências que contribuem para a estabilização do RNA.

Em estudos recentes, estruturas como insulators, enhancers são adicionados aos vetores. São sequências de DNA que mesmo distantes dos promotores (as vezes quilobases) controlam a expressão gênica, fazendo com que o RNA seja melhor expresso e mais vezes (HOUDEBINE, 2000; FAN e WATANABE, 2003; HOUDEBINE, 2005). Adicionado mais estruturas, os vetores de transgenia estão ficando cada vez maiores, as vezes 100 kb, necessitando de outras tecnologias para comportar o tamanho, como cromossomos artificiais de bactérias e leveduras.

2.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Inúmeras substâncias recombinantes, como a insulina e o hormônio de crescimento humano, podem ser produzidas em microorganismos como bactérias (CLARK, 1998). Entretanto, para a produção de proteínas que precisam de modificações pós-traducionais, que não se consegue em microorganismos, torna-se importante o uso de animais transgênicos. Leite, ovo, sangue, plasma seminal e casulo do bicho da seda são candidatos para produção de proteínas recombinantes em escala industrial (HOUDEBINE, 2000).

Outra possibilidade é cultivar células transgênicas para produzir estas proteínas, mas a quantidade produzida em animais transgênicos é pelo menos 10 vezes maior do que em cultura de células. Sendo assim, os custos são reduzidos e a capacidade de produção é aumentada (LYNCH, 2000).

A glândula mamária é escolhida como bioreator porque genes de proteínas do leite são expressos especificamente e em altos níveis. Elementos

regulatórios destes genes, os chamados promotores, podem ser usados para dirigir a expressão de genes exógenos neste tecido. É possível usar inúmeros promotores, como β -caseína, α S1-caseína, BLG (Bovine Beta-Lactoglobulin), WAP (Whey Acidic Protein) e α -lactalbumina. Além disso, o leite é facilmente colhido, sem prejudicar o animal (CLARK, 1998).

Genes codificadores de muitas proteínas humanas já foram clonados, entre eles insulina, hormônio de crescimento, proteína C, ativador de plasminogênio tecidual e fatores VII, VIII e IX (CLARK, 1998). Estes e muitos outros podem ser utilizados para produzir animais transgênicos. Mais de 50 proteínas humanas já foram produzidas no leite de animais transgênicos, com fins nutricêuticos ou farmacêuticos (WALL et al., 1997; UUSIN-OUKARI et al., 1997; RJUKELS, et al 1997; RUDOLPH et al., 2000; NIEMANN e KUES, 2003). Inclusive vacinas para uso em humanos para rotavirus já foram produzidas no leite de coelhas (SOLER et al., 2005).

A quantidade de proteína produzida no leite é variável, dependendo da espécie, da sequência de DNA e da complexidade. Proteínas complexas, como fator VIII de coagulação, produz-se microgramas por mililitro de leite. Já para proteínas mais simples chega a miligramas. Nestes casos, animais de laboratório normalmente são utilizados para testar os vetores e as proteínas geradas, mas para a viabilizar a comercialização é importante animais que tenham produção de leite maior como cabras, ovelhas, porcos e vacas (NIEMANN et al 2003; FAN e WATANABE, 2003).

2.4 ERITROPOIETINA

O gene da hEPO está localizado no cromossomo 7 (q11-q22). É composto por cinco exons e quatro introns, que geram um pro-hormônio com 193 aminoácidos e antes de ser liberado perde 27aa, gerando a EPO com 166 aa em sua forma madura, o que resulta em uma proteína de 18kDa. Pode ser glicosilada três ou quatro vezes e pode chegar a 30kDa. A glicosilação não altera sua atividade *in vitro*, mas é muito importante para sua atividade *in vivo* (JELKMANN, 1992; TOLEDO et al., 2005, JELKMANN, 2007; SPERB, 2008).

Em condições de hipóxia, causada por número reduzido ou funcionamento deficiente dos eritrócitos, os tecidos não são supridos com oxigênio suficiente. Então um fator humoral é liberado e estimula a eritropoiese. Este fator é chamado de eritropoietina (EPO), sendo o rim o principal local de produção na vida adulta e o fígado na vida fetal (JELKMANN, 2007).

A EPO estimula células tronco da medula óssea, como proeritroblastos, eritroblastos basófilos e eritroblastos policromatófilos jovens para aumentar sua atividade mitótica e se diferenciarem em eritrócitos. É usada no tratamento de anemia crônica não regenerativa em pacientes com falência renal crônica, os quais tem diminuição da produção de eritropoietina pelo rim lesado. Também é utilizada após transplante renal e em casos de anemia causadas por tumores, cirurgias e HIV. Está sendo utilizada em novos tratamentos de doenças auto-imunes, isquemia cerebral, injúrias na medula espinhal e doenças cardíacas (LIPPIN, 2005; SPERBS, 2008). Também é utilizada como doping em atletas.

Para tanto, utiliza-se a eritropoietina recombinante humana (rhEPO) produzida em células de ovário de hamster (CHO) que possui elevado custo. O tratamento é eficaz e aumenta os níveis de hemoglobina e o hematócrito, melhorando o quadro clínico e a qualidade de vida dos pacientes (TOLEDO et al., 2005).

A eritropoietina recombinante humana em animais transgênicos foi produzida em coelhos (MASSOUD et al.; 1996; AGUIRRE et al., 1998; MIKUS et al., 2004), camundongos (MIKUS et al., 2001; KWON et al., 2006) e porcos (PARK, et al., 2006, CHO et al., 2008), sob ação de diferentes promotores, sendo o mais frequente o WAP de camundongos e coelhos. Em diversos trabalhos em camundongos e coelhos ocorreram falhas na glicosilação, resultando na produção de proteínas sem ou com reduzida atividade biológica. Em todos os trabalhos foram relatados problemas decorrentes da expressão ectópica da EPO, incluindo morte precoce, diminuição do tamanho da ninhada, esplenomegalia e alterações do hemograma, entre outras. Isso pode ter ocorrido por falta de especificidade dos promotores (MASSOUD et al.; 1996; AGUIRRE et al., 1998; MIKUS et al., 2001; MIKUS et al., 2004; KWON et al., 2006; PARK, et al., 2006, CHO et al. 2008)

Neste trabalho será testado em camundongos os vetores contendo as regiões promotoras da α -lac e BGL bovinos para produzir a rhEPO no leite, visando futura aplicação desta tecnologia em bovinos.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE

A construção dos vetores com os promotores α -lactalbumina e β -lactoglobulina permitirá produzir a hEPO glicosilada no leite de camundongas transgênicas, dirigindo a expressão exclusivamente para a glândula mamária.

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram

- Construir vetores plasmidiais, com diferentes regiões promotoras que possam dirigir a produção hrEPO no leite de camundongas;
- Inserir os vetores em CTE murinas e selecionar as positivas para as sequências de interesse;
- Produzir camundongas transgênicas pela técnica de agregação de quimeras;
- Quantificar a rhEPO produzida no leite e a glicosilação pela técnica de Western Blotting.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR ALFA-LACTALBUMINA

As etapas que envolvem as técnicas de Biologia Molecular foram desenvolvidas no Laboratório de Salmonella, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, sob supervisão da pesquisadora Elisabeth Angélica Leme Martins.

4.1.1 Extração de DNA

O promotor específico e a região codificadora do leite foram amplificados por PCR a partir de DNA extraído de células brancas do sangue de fêmeas bovinas de alta produção leiteira, colhido na Fazenda Colorado – Araras-SP.

Para obtenção do DNA de células brancas, o sangue foi colhido em tubos vacutainer com Citrato de Sódio com auxílio de seringa e agulha. Foi transportado a 25°C até o laboratório onde foi centrifugado por 30 minutos a 4000g em Histopaque® (Sigma) para separação das células brancas. O DNA genômico foi extraído usando kit comercial, seguindo as instruções do fabricante (Amersham), resumidamente as células foram centrifugadas, ressuspensas e incubadas em solução de lise. A solução foi neutralizada e transferida para uma coluna de GFX. Após centrifugação, o DNA foi lavado e eluído da coluna.

O gene da hEPO foi amplificado por reações de PCR, com DNA extraído de sangue humano colhido no laboratório. Os demais procedimentos ao qual o sangue bovino foi submetido foram repetidos com o sangue humano.

4.1.2 PCRs e Clonagens em vetores plasmidiais

Oligonucleotídeos iniciadores foram escolhidos com o auxílio do programa GeneRunner para todos os fragmentos, usando como base as sequências encontradas no banco de dados do Pubmed. Em alguns deles foram adicionadas sequências para ligação de enzimas de restrição, o que permitiria posterior transferência dos fragmentos clonados individualmente para um único vetor. Cada fragmento gerado com o tamanho esperado pela reação de PCR foi purificado a partir da banda formada em gel de agarose 0,8%, utilizando kit comercial (GE ou Invitrogen). O material purificado foi inserido por clonagem no vetor comercial pGem T-easy[®] (Promega), seguindo as recomendações do fabricante e introduzido em bactérias DH5 α competentes pelo método de Cloreto de Cálcio. Após 16 horas de crescimento em meio de cultura sólido em placas de petri, as colônias foram selecionadas pela presença de X-galactose (colônias brancas) e resistência à ampicilina (amp) quando cresceram em placas de 2YT/amp. Várias colônias foram inoculadas individualmente em 5mL de meio líquido (2YT- amp) para amplificação do plasmídeo dentro das bactérias. Após 16 horas de cultura a 37°C sob agitação de 170rpm, foi realizado um teste de fenol-clorofórmio com 400 μ L de meio para selecionar as bactérias positivas pelo tamanho dos fragmentos gerados em gel de agarose 1% após eletroforese, sempre comparando com um padrão negativo. O restante do meio foi submetido a miniprep comercial (Promega, Ge ou Quiagen) para extração do DNA plasmidial. Os insertos formados foram confirmados por análise dos fragmentos de restrição e sequenciamento. Depois que os 3 insertos foram clonados individualmente eles foram unidos (Figura 1) através de repetidas digestões com enzimas de restrição e clonagens.

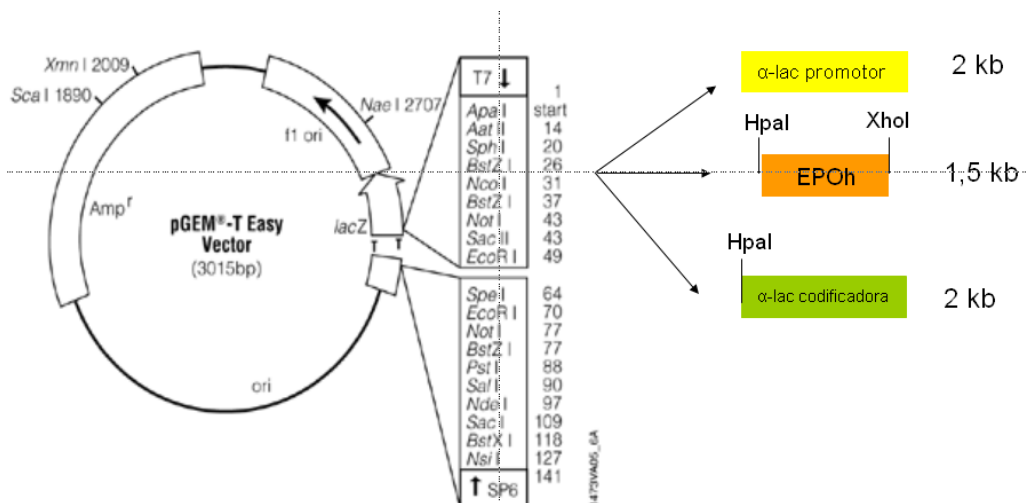


Figura 1 - Desenho esquemático do vetor alfa-lac

4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR BGL

Para a construção desse vetor o plasmídeo Bluescript contendo a região promotora da BGL e a região 3' da β -caseína bovina foi gentilmente cedido pelo pesquisador Stas Gorotdesk.

4.2.1 PCR e Clonagem

O gDNA da hEPO foi amplificado por PCR a partir do DNA extraído de sangue humano. Novos oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados, contendo sítios para reconhecimento das enzimas de restrição *Cla* I no primer F e *Hind* III no reverse. Os fragmentos foram amplificados, purificados e clonados em pgem-T-easy conforme descrito no item 4.1.1. Após digestão com enzima de restrição, o fragmento gerado foi purificado do gel de agarose e transferido para o plasmídeo Blueskript (Figura 2). Os resultados foram confirmados por análise de restrição e seqüenciamento.

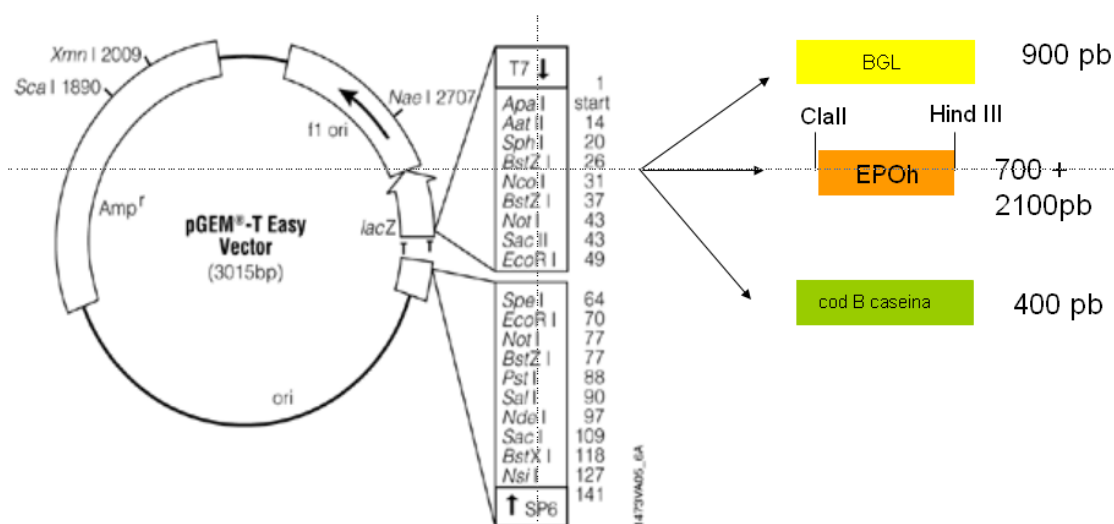


Figura 2 – Desenho esquemático do vetor BGL

4.3 CULTURA DE CTE MURINAS

As células tronco da linhagem USP 1 foram gentilmente fornecidas pela pesquisadora Irina Kerkis, que também ofereceu treinamento necessário para manter as células indiferenciadas ao longo das passagens.

4.3.1 Obtenção de fibroblastos fetais de camundongos (MEF)

Os fibroblastos foram obtidos de fetos murinos obtidos aos 15 dias de gestação, que foram decaptados e fragmentados. Foram adicionados a tripsina 0,01%, que após 30 minutos a 37°C, a solução foi pipetada vigorosamente para lisar os fragmentos. Meio de cultura DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium* – Gibco, Carlsbad, California, EUA) contendo 10% de SFB com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma) foi adicionado para inativar a enzima. A solução foi transferida para placas e incubadas à 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Quando os fibroblastos atingiram 90% de confluência, foi adicionada tripsina 0,1% em PBS (Gibco) para retirada das células aderidas às placas, sendo transferidas para nova placa. Cada vez que as células foram transferidas de uma placa para outra, diz-se que sofreram uma passagem. Após a terceira passagem, os fibroblastos foram congelados em DMEM com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% SFB. As células foram descongeladas e cultivadas em DMEM com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina e irradiadas com 4 krad (Césio 137; IBL-637, Oris Industrie) para inativação da proliferação (mitose) e novamente congeladas, sendo descongeladas somente no momento do uso.

4.3.2 Cultura de células tronco-embrionárias

As células foram descongeladas e lavadas por centrifugação em meio de cultura DMEM com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina. O sedimento foi ressuspensionado em meio GMEM-ES, constituído por GMEM (Glasgow Modified Eagle Media - Sigma), 0,1 mM β-mercaptoetanol (Sigma), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco) e 15% SFB (Hyclone, Logan, Utah, EUA). O meio foi trocado diariamente e as células passadas para novas placas a cada 2 ou 3 dias. Para isso as células foram lavadas duas vezes em PBS sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ e foi adicionada tripsina 0,1%. As células foram observadas em microscópio invertido até soltarem do fundo da placa, quando o meio de cultivo DMEM foi adicionado para inativar a tripsina. Após

centrifugação o sedimento foi ressuspenso em meio GMEM-ES e as células transferidas para garrafa T-25 previamente preparada com um filme de gelatina de pele suína 0,1%, para separar as CTE do MEF inativado. Após 20 minutos o sobrenadante, contendo principalmente as CTE foi transferido para uma nova garrafa contendo MEF inativado, descongelado previamente, com meio GMEM-ES.

4.3.3 Eletroporação das CTE

Seguindo as recomendações do fabricante Multiporator (Eppendorf) foi realizado um piloto para escolha da voltagem e do tempo necessário para a eletroporação. Para avaliar a eficiência foi utilizado o plasmídeo pCX-GFP, linearizado com a enzima BamHI e purificado por precipitação. As células tiveram o meio trocado pela manhã e após 4 horas procedeu-se com a tripsinização, para garantir que as células estariam em crescimento exponencial. Após a separação do MEF inativado com gelatina, as células foram sedimentadas e ressuspendidas em tampão hiposmótico fornecido pelo fabricante na concentração de 1×10^6 células/mL. O DNA foi adicionado (20 µg/mL) e as células divididas nas cubetas de eletroporação e submetidas a choques de 130, 260 e 390V durante 50 ou 80 µs. Após 5 minutos as células foram removidas com auxílio de pipeta Pasteur e transferidas para placas de 35mm contendo MEF inativado. As células foram avaliadas em microscópio de epifluorescência após 24 e 48 horas.

4.4 PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

4.4.1 Padronização da técnica de agregação de quimeras

Camundongas CD1 criadas no biotério da FMVZ foram superovuladas com 5UI de eCG e, após 46-48 horas, com 5UI de hCG. Após o hCG, foram acasaladas, na manhã do dia seguinte, o plug vaginal foi verificado e as fêmeas positivas separadas. Cerca de 2,5 dias após o acasalamento, as fêmeas foram sacrificadas em câmara de CO₂ e os ovidutos lavados para colher os embriões, que estavam em estágio de mórula. Os embriões foram avaliados quanto à morfologia e os melhores tiveram a zona pelúcida removida quimicamente com solução de Tyrode[®] (Sigma). Os embriões sem zona pelúcida foram distribuídos individualmente em poços de uma placa de 96 poços.

Algumas células tronco-embrionárias foram colocadas sobre os embriões para agregação. Foram cultivados em meio KSOM[®] (Specially Media - Millipore) em estufa com 5% CO₂ em ar, 37°C e alta umidade por 24 horas. Os blastocistos foram transferidos cirurgicamente para o útero de camundongas receptoras pseudogestantes, 3,5 dias pós-acasalamento com machos vasectomizados.

5 RESULTADOS

5.1. CONSTRUÇÃO DO VETOR ALFA-LACTALBUMINA

Para amplificação da região promotora de 2 kb foram realizadas 50 reações de PCR (Figura 3) As PCRs sempre resultavam em um fragmento de 1,5 kb, correspondente a um pseudogene. A clonagem também foi pouco eficiente, resultando em somente uma colônia positiva de 11 testadas, entrando no sentido correto do pgem.

Para a hEPO, 18 PCRs foram necessárias para gerar o fragmento de 1,5 kb, mesmo sendo amplificada a partir de plasmídeo contendo a EPO previamente amplificada de gDNA (Figura 3). O fragmento foi inserido em Pgem-t-easy e 16 colônias brancas foram inoculadas em meio líquido, das quais, após Miniprep e digestão com enzimas de restrição uma colônia positiva, com o mesmo sentido no pgem foi encontrada.

Para a região codificadora, de 2,1kb, não houve problemas na amplificação, entretanto a clonagem privilegiava a entrada do fragmento em um sentido no plasmídeo, o que dificultou a união dos fragmentos (Figura 3). Foi necessário inocular 144 colônias brancas para encontrar 2 positivas com sentido correto no plasmídeo. As sequências foram confirmadas por análise de fragmentos de restrição e sequenciamento, verificando se a sequência tinha homologia com as sequências depositadas no Pubmed.

Os plasmídeos contendo a região promotora e a EPO foram digeridos com HpaI e SacI, e os fragmentos correspondentes purificados para realizar nova clonagem, na tentativa de unir os fragmentos. No entanto, após a digestão do plasmídeo com a região promotora, o fragmento liberado era muito pequeno, o que dificultava a separação dos plasmídeos digeridos com uma enzima dos digeridos com as duas, que eram os fragmentos de interesse. Após a clonagem, os plasmídeos linearizados fechavam novamente e geravam colônias brancas, contendo a região promotora e não a soma dos fragmentos. Foi necessário inocular 111 colônias para encontrar 2 positivas.

O novo plasmídeo gerado foi digerido com Xho e Sac, assim como a região codificadora. Foram selecionadas 2 colônias positivas de 12 inoculadas.

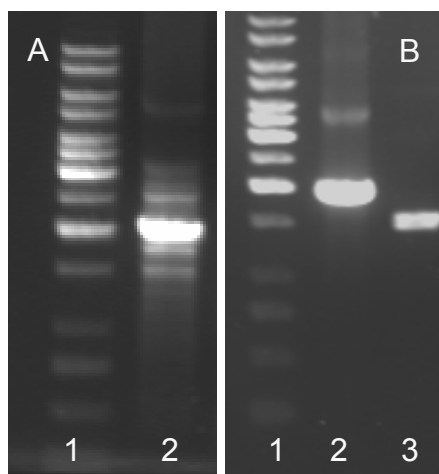


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% A) 1 – Marcador de Peso Molecular Gene Ruler, 2- Produto de PCR correspondente a região promotora da α -Lactalbumina bovina (2100 pb); B) 1 – Marcador de peso molecular, 2 – Produto de PCR correspondente à região codificadora do gene da α -Lactalbumina (2000 pb).

5.2. CONSTRUÇÃO DO VETOR BGL

A EPOh foi amplificada a partir de plasmídios contendo a hEPO, previamente amplificada do gDNA e clonada em pgem-T-easy. A PCR foi padronizada após 12 tentativas. O fragmento de 2700 pb foi clonado em pgem-t-easy. Foram necessárias 118 colônias para encontrar uma positiva. Este plasmídeo e o vetor contendo a região promotora da BGL e a região 3'da β -caseína bovina foram digeridos e a EPOh inserida entre eles. As sequências foram confirmadas por análise de fragmentos de restrição e seqüenciamento, verificando se a sequência tinha homologia com as sequências depositadas no Pubmed.

5.3. CULTURA E ELETROPORAÇÃO DAS CTE

As células tronco embrionárias foram mantidas indiferenciadas por pelo menos 5 passagens. O grupo que apresentou melhores resultados quanto a células fluorescentes após a eletroporação foi 390V por 80 μ s, no entanto, visualmente não houve grandes diferenças quanto ao número de colônias e sim a morfologia. As colônias positivas (Figura 4) sempre foram menores e mais escuras que as negativas em um mesmo tratamento. Após 3 passagens, as células positivas morreram ou se diferenciaram.

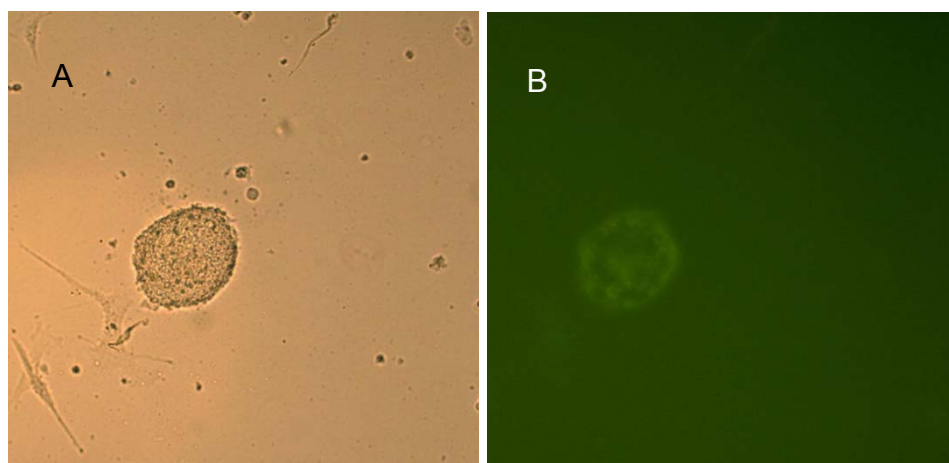


Figura 4 – Colônias da Linhagem USP1 na 19^a passagem, submetidas a eletroporação. A) Colônia visualizada sob microscopia óptica; B- Colônia GFP positiva visualizada em microscopia de epifluorescência.

5.4. PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Toda a padronização necessária para a produção de animais transgênicos foi realizada com sucesso, obtendo seis animais nascidos com mosaicismos de pelagem (Figura 5). No entanto os animais transgênicos não foram produzidos, pois não se conseguiu cultura de CTE positivas com os vetores.

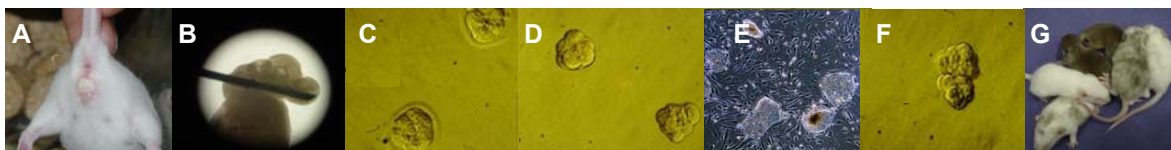


Figura 5 – Produção de camundongas transgênicas A) Plug vaginal de fêmea CD1 observado na manhã após a copula; B) Agulha inserida no oviduto removido de camundongas, pronto para efetuar colheita de embriões; C) Mórulas de camundongas colhidas 2,5 dias após o acasalamento; D) Mórulas após a remoção da zona pelúcida; E) Cultura de CTE sobre a monocamada MEF; F) Mórula sem zona pelúcida com agregado de células tronco embrionárias; G) Neonatos quiméricos nascidos após a transferência dos embriões para fêmeas pseudogestantes.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No passado, proteínas humanas usadas no tratamento de pacientes eram purificadas de animais e posteriormente de fluidos de doadores ou tecidos de cadáveres humanos. Como a quantidade recuperada de cada indivíduo era baixa, era preciso colher material de dezenas ou centenas de pessoas, dependendo da proteína, e com a descoberta da transmissão de doenças, fez-se necessária a implementação de novos sistemas de produção, capazes de sintetizar as proteínas, reduzindo os riscos de contaminação cruzada (HOUEBINE, 2008). Proteínas simples como a insulina, podem ser produzidas em bactérias ou leveduras, no entanto proteínas complexas precisam de sistemas que possuam enzimas necessárias para modificações pós traducionais como a glicosilação. Para contornar esta situação, proteínas estão sendo produzidas em animais transgênicos, inclusive a anti-trombina III já está liberada para o uso na Europa desde 2006 e proteínas como alfa-glucosidase, HGH, fibrinogênio, albumina, colágeno, alfa-1-antitripsina, vacina contra malária e anticorpos estão em testes pré-clínicos ou fase 2 (NIEMANN E KUES, 2007).

A hEPO é uma proteína de grande interesse comercial devido ao seu amplo uso terapêutico. Por ser uma proteína que precisa ser glicosilada para apresentar atividade biológica, é produzida em cultura de células CHO, em um processo caro e pouco produtivo, no entanto, o único disponível. Embora a rhEPO já tenha sido expressa em camundongos, coelhos e suínos com diferentes vetores, somente em suínos a proteína foi obtida com a glicosilação necessária para a atividade biológica. Além disso, os promotores WAP de coelhos (MASSOUD, 1996; AGUIRRE et al.; 1998; MIKUS et al, 2001; MIKUS et al., 2004; e camundongos (Park et al.; 2006) e Beta-Caseína de cabras (CHO et al.; 2008) não foram capazes de dirigir a expressão somente para a glândula mamária, resultando em alterações nos animais transgênicos. Os animais apresentaram esplenomegalia, hepatomegalia, alteração de hematócrito, redução do número de filhotes, oligospermia e morte prematura dos animais por exaustão da medula óssea. As alterações em suínos foram menos prejudiciais a higiene dos animais.

Na tentativa de sanar estes problemas os promotores α -lac e BGL, foram construídos no presente trabalho. A hipótese de que seriam capazes de produzir a rhEPO no leite de camundongos transgênicos, com expressão exclusivamente na glândula mamária não pode ser testada pois os animais transgênicos não foram gerados. É possível que os resultados sejam diferentes, pois entre as proteínas expressas com sucesso com o promotor α -lac estão o IGF-1 de suínos (WHEELER et al., 2003), fator VIII de coagulação (CHEN et al., 2002). Com o promotor BGL foram produzidas proteínas como CSF-1 e lactoferrina humanos.

Aguirre et al. (1998) discutiram a posição de integração no genoma também influencia a expressão do transgene, pois pode ocorrer em sítios de DNA que definem regiões geneticamente funcionais e pouco expressos. Isso significa que não depende somente da construção gênica.

Além disso, é possível que a espécie na qual a produção ocorra seja importante. Talvez quanto mais homóloga ela seja a humanos, as alterações as tradicionais sejam mais próximas as da proteína original, como por exemplo quando a rhEPO foi produzida em suínos com o promotor de camundongos (Park et al., 2006), os efeitos não foram tão prejudiciais aos animais.

Com a posterior conclusão deste trabalho será possível testar a influência dos vetores na produção da hrEPO e analisar os resultados obtidos com a expressão dirigida por promotores bovinos pela primeira vez utilizados com a hEPO, uma proteína de grande interesse comercial, mas com problemas na expressão em animais transgênicos.

7 CONCLUSÕES

Foi possível construir os vetores com os promotores alfa-lactalbumina e BGL para expressão da hrEPO no leite.

As CTE foram cultivadas e mantidas indiferenciadas ao longo das passagens e foi estabelecido o protocolo para eletroporação destas células, utilizando plasmídeo com fluorescência.

Não foram obtidas CTE positivas para os vetores, pois as células não foram eletroporadas.

A técnica de agregação de quimeras para a produção de animais transgênicos foi padronizada, no entanto os animais transgênicos não foram gerados pela falta das CTE positivas.

A análise da hrEPO no leite não foi realizada pela ausência da produção dos animais transgênicos.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A.; CASTRO-PALOMINO, N.; LA FUENTE, J.; CASTRO, F. O. Expression of human erythropoietin transgene 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.

CHO, S.K.; HWANG, K.C.; CHOI, Y.J.; BUI, H.T.; NGUYEN, V.T.; PARK, C.; KIM, J.H.; ; KIM, J.H. Production of transgenic pigs harboring the human erythropoietin (hEPO) gene using somatic cell nuclear transfer. **Journal of Reproduction and Development**, in press, 2008.

CLARK, A. J. The mammary gland as a bioreactor: Expression processing and production of recombinant proteins. **Journal of Mammary Gland and Neoplasia**, v. 3, n. 3, 1998

CHEN, C.M.; WANG, C.H.; WU, S.C.; LIN, C.C.; LIN, S.H.; CHENG, W.T. Temporal and spatial expression of biologically active human factor VIII in the milk of transgenic mice driven by mammary-specific bovine alpha-lactalbumin regulation sequences_ **Transgenic Research**, v. 11, issue 3, p. 257-268, 2002.

FAN, J.; WATANABE, T.; Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, issue. 3 , p. 261-282, 2003.

GORDON, M.F.; SCANGOS, G.A.; PLOTKIN, D.J.; BARBOSA, J.A.; RUDDLE, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 77, p. 7380-7384, 1980.

GRIFFITHS, Betting on biogenerics. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3 p.197-198, 2004.

HODGES, C.A.; STICE, S.L. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 81, 2003.

HOUEBINE, L.M. Relations between animal transgenesis and reproduction. **Reprod. Nutr. Dev.** v. 45, n.3, p.363-376 , 2005.

HOUEBINE, L.M. Transgenic Animals bioreactor. **Transgenic Research**, v. 9, n. 4-5, 305-320, 2000.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

JELKMANN, W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. **European Journal of Haematology**, v. 69, Issue 5-6, p. 265-274, 2008.

JELKMANN, W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. **Methods Enzymol.** v. 435, p. 179-197, 2007.

KEEFER, C.L. Production of bioproducts through the use of transgenic animals models. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 5-12, 2004.

LEE, C.S.; FANG, D.B.; LEE, Y.S.; ZHENG, G.D.; OH, K.B.; YOUN, W.S.; HAN, Y.M.; KIM, S.J.; LIM, J.H.; SHIN, S.T.; JIN, S.W. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus*. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 57-63, 2000.

LIPPIN, Y.; DRANITZKI-ELHALEL, M.; BRUKK-ALMON, E.; MEI-ZAHAV, C.; MIZRACHI, S.; LIBERMAN, Y.; TAINA, A.; KAPLAN, E.; PODJARNY, E.; ZEIRA, E.; HARATI, M. CASADEVALL, N.; SHANI, N.; GALLUN, E. Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2280-2286, 2005

LYNCH, T.J. Biotechnology: alternatives to human plasma derived therapeutic proteins. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 13, n. 4, p. 669-688, 2000.

MAGA, E.A. The use of recombinase proteins to generate transgenic large animals. **Cloning And Stem Cells**, v.3, n. 4, p. 233-241, 2001.

MASSOUD, M.; ATTAL, J.; THEPOT, D.; POINTU, H.; STINNAKRE, M.G.; THERON, M.C.; LOPEZ, C.; HOUDEBINE, 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.

MCCREAT, K.J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K.H.S.; COLMAN, A.; SCHNLEKE, A.E.; KIND, A.J. Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1066-1069, 2000.

MIKUS, T.; POLPSTEIN, M. ; SEDLAKOVÁ, J.; JENIKOVÉ, G.; TREFIL, P.; LIDICKY, J.; MALU, 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.

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 Biology**, v. 47, n.6, p.187-95, 2001

NIEMANN, H.; KUES, W. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 297-317, 2003.

NIEMANN, H; HALTER, R.; CARNWATH, J.W.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; PAUL, D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. **Transgenic Research**, v.8, n. 3, p. 237-247, 1999.

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

RIJNKELS, M.; KOOIMAN, P.M.; PLATENBURG, G.J.; VAN DIXHOORN, M.; NUIJENS, J.H.; de BOER, H.A.; PIEPER, F.R. High-level expression of bovine alpha s1-casein in milk of transgenic mice. **Transgenic Research**, v. 7, issue 1, p. 5-14, 1998.

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

SUKAOKAR, M.; BRADLEY, A. Targeting sheep. **Nature**, n. 6790, v. 405, p. 1004-1005, 2000.

SPERB, F. **Expressão Gênica da Eritropoietina humana em plantas**. Dissertação. 2008. 70f (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,.

SOLER, E.; LE SAUX, A.; GUINUT, F.; PASSET, B.; COHEN, R.; MERLE, C.; CHARPILLENNE, A.; FOURGEUX, C.; SOREL, V.; PIRIOU, A.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; COHEN, J.; HOUDEBINE, L.M. Production of Two Vaccinating Recombinant Rotavirus Proteins in the Milk of Transgenic Rabbits, **Transgenic Research**, v. 14, n. 6, p. 833-844, 2005

SUKOYAN, M.A.; KERKIS, A.Y.; MELLO, M.R.B.; KERKIS, I.E.; VISINTIN, J.A.; PEREIRA, L.V. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 535-542, 2002.

TOLEDO, J.R.; SÁNCHEZ, O.; SEGUÍ, R.M.; GARCIA, Y.F.; RODRIGUEZ, M.P.; CREMATA, J.A. Differential in vitro and in vivo glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1726, p. 48-56, 2005

TOLEDO, J.R.; SÁNCHEZ, O.; SEGUÍ, R.M.; GARCIA, Y.F.; MONTAÑEZ, M.; RODRIGUEZ, M.P.; CREMATA, J.A. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 225-235, 2006

UUSI-OUKARI, M.; HYTTNEN, J.M.; KORHONEN, V.P.; VASTI, A. ALHONEN, L. JANNE, O.A., JANNE, J. Bovine α S1-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, 1996.

WALL, R.; KERR, D.; BONDIOLI, K. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **Journal Dairy Science**, v.80, p. 2213-2224, 1997.

WHEELER, M.B.; CHOI, S.J. Embryonic stem cells and transgenics: recent advances. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 25, p. 64-83, 1997.

WHEELER, M.B. Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. **Journal of Animal Science**, v. 81, sup. 3, p. 32-37, 2003.

WHEELER, M.B.; WALTERS, E.M.; CLARK, S.G. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 265-289, 2003.

VAN REENEN, C.G.; MEUWISSEN, T.H.E.; HOPSTER H.; OLDENBROEK, K.; KRUIP, T.A.M.; BLOKHUIS H.J. Transgenesis may affect farm animal welfare: a case for systematic risk assessment. **Journal of Animal Sciences**, v. 79, p. 1763-1779, 2001.

VAZQUEZ, K.M.; MALBURGUER, K.; INTODY, Z.; WILSON, J.H. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination, **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 98, n. 15, p. 8403-8410, 2001.