LUCAS MARTINS CHAIBLE

**CRIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO TRANSGÊNICO INÉDITO DE
CAMUNDONGOS COM EXPRESSÃO CONDICIONAL DO GENE DA
CONEXINA43**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2013

LUCAS MARTINS CHAIBLE

**CRIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO TRANSGÊNICO INÉDITO DE
CAMUNDONGOS COM EXPRESSÃO CONDICIONAL DO GENE DA
CONEXINA43**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi
Corat

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Chaible, Lucas Martins.

Criação e caracterização de um modelo transgênico inédito de camundongos com expressão condicional do gene da conexina 43 / Lucas Martins Chaible. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Transgênese animal.

Versão do título para o inglês: Establishment and characterization of a novel transgenic mouse model with conditional expression of connexin 43 gene.

1. Conexina 43 2. Camundongo 3. Transgênese animal
4. Microinjeção pronuclear 5. Tet-On 6. Doxíciclina I. Dagli, Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0164/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Martins Chaible.

Título da Tese: Criação e caracterização de um modelo transgênico inédito de camundongos com expressão condicional do gene da conexina 43.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Criação e caracterização de um modelo transgenico inédito de camundongos com expressão condicional do gene da conexina 43: um novo paradigma no estudo da comunicação intercelular funcional", protocolado sob o nº1816/2009, utilizando 200 (duzentos) camundongos, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25/11/2009.

We certify that the Research "Production and characterization of transgenic mouse model to inducible cx43 gene: new model in study of cellular communication" protocol number 1816/2009, utilizing 200 (two hundred) mice, under the responsibility Profa Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/25/2009.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

*À minha família por todo o suporte e incentivo
à minha formação, pelo apoio incondicional ao
longo dos anos. Sem vocês nada seria possível...*

*Em memória do meu pai, tenho certeza que ele
ainda me guia, e hoje realizo um sonho dele.*

*Em memória do Gregor, meu fiel amigo ao longo
de tantos anos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Lúcia Zaidan Dagli, que aceitou a minha ideia de trabalho, sempre apoiando e incentivando. Deixou-me voar com asas próprias.

Ao meu amigo e co-orientador Marcus Corat, que me ofereceu apoio, conhecimentos e amizade ao longo desses anos. Meu exemplo de pesquisador.

À minha mãe, tia, avó, irmãos, cunhadas, e sobrinhos que são a minha sustentação, minha família, minha razão, minha vida.

À minha namorada Angela, que chegou num momento delicado da minha vida, mas soube dar um novo rumo para nós...

À eterna amiga e professora Cyntia, pelos primeiros e segundos passos na Biologia Molecular. Sei que onde vc está ainda faz suas mágicas.

À Marguite, mais que uma amiga, uma segunda mãe que adotei ao longo desses anos.

Aos Professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e tantos outros da Universidade de São Paulo pelas aulas e ajudas.

A todos os companheiros de trabalho e amigos do laboratório de Oncologia Experimental que proporcionaram momentos inesquecíveis.

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati e o Dr. Daniel Sanches, mais que amigos, meus orientadores.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos vocês, deixo o meu...

Muito Obrigado

Principles for the Development of a Complete Mind: Study the science of art. Study the art of science. Develop your senses- especially learn how to see. Realize that everything connects to everything else

Leonardo Da Vinci

1452 - 1519

RESUMO

Chaible LM. Criação e caracterização de um modelo transgênico inédito de camundongos com expressão condicional do gene da conexina 43. [tese (Doutorado em Biotecnologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As conexinas (Cx) são proteínas que compõem as junções comunicantes do tipo gap, e dentre as diversas isoformas presentes nos tecidos animais, a Cx43 é a mais prevalente e, conseqüentemente, a mais estudada. A diminuição de sua expressão está relacionada com diversas alterações fisiológicas, entre elas algumas síndromes, malformações genéticas, aumento da proliferação celular e da carcinogênese. Sua importância *in vivo* foi relatada em camundongos com deleção de um dos alelos de Cx43 (Cx43^{+/-}). No entanto, os animais knockouts completos (Cx43^{-/-}) não são viáveis após o nascimento devido malformação cardíaca, revelando a importância vital dessa proteína no desenvolvimento cardíaco. Devido esta inviabilidade técnica e fisiológica, centenas de pesquisas científicas foram realizadas apenas com animais heterozigotos (Cx43^{+/-}) comparando-os com animais wild-type (Cx43^{+/+}). Assim, ainda não foi possível estabelecer a real participação da Cx43 nos diferentes processos patológicos, uma vez que o modelo atual não permite a deleção completa da conexina 43 nos diferentes tecidos. Neste contexto, este trabalho propõe a criação de um novo modelo para o estudo da comunicação intercelular funcional, por meio da produção de camundongos geneticamente modificados, viabilizando os animais adultos Cx43^{-/-}. Para isso, um transgene contendo um sistema de expressão induzível reestabelecerá a comunicação intercelular por meio da reintrodução do gene Cx43, e dessa forma evitando a letalidade fetal. Por meio de técnicas de Biologia Molecular é possível construir vetores de expressão gênica e validar a sua funcionalidade em células cultivadas *in vitro*, e após essa validação os vetores obtidos são transferidos para zigotos murinos por meio da técnica de microinjeção pronuclear, na esperança de obter camundongos que alberguem em seu genoma o transgene integrado de forma estável. Nesse projeto conseguimos com sucesso construir um sistema de expressão induzida do gene Cx43 mediada pelo fármaco doxíciclina. Esse sistema é baseado em dois vetores plasmídeos, sendo o primeiro pCx43-Tet3G que é responsável pela proteína ativadora rTetR que é sensível à doxíciclina e o segundo vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen que possui o promotor sensível à proteína rTetR e quando ativado expressa o gene Cx43 de interesse mais a proteína repórter ZsGreen. A funcionalidade dos vetores foi confirmada em testes *in vitro* utilizando células HeLa e células E10, onde percebemos que a expressão é dependente da dose de doxíciclina, e que o sistema é muito sensível à droga, pois apenas 10ng/mL são suficientes para detectarmos a presença da proteína Cx43 na técnica de Western blotting. Nos experimentos *in vivo*, os vetores foram microinjetados em pronúcleo de zigotos murinos e obtivemos taxas de nascimento compatíveis com os descritos na literatura, porém em mais de 100 animais nascidos nenhum deles

apresentou genótipo positivo para o transgene, o que foi um imprevisto, já que a literatura descreve uma taxa de sucesso de aproximadamente 3% em transgênese por microinjeção pronuclear. Esse breve obstáculo que nos deparamos já esta sendo superado por novas técnicas que estamos realizando e descrevemos adiante nesse manuscrito, e temos certeza que em breve teremos esse modelo animal disponível para a comunidade científica.

Palavras-chave: Conexina43. Camundongo. Transgênese animal. Microinjeção pronuclear. Expressão induzível. Tet-On. Doxíciclina.

ABSTRACT

Chaible LM. Establishment and characterization of a novel transgenic mouse model with conditional expression of connexin 43 gene. [Ph. D. thesis (Biotechnology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The connexin (Cx) are proteins which comprise the gap junctions, connecting and among various isoforms present in animal tissue, the Cx43 is the most prevalent and studied. The decrease of its expression is related to various physiological changes, including some syndromes, genetic malformations, increased of cell proliferation and carcinogenesis. Its importance *in vivo* has been reported in mice with deletion of one allele of Cx43 (Cx43^{+/-}). However, the complete knockout animals (Cx43^{-/-}) are not viable after birth due cardiac malformation, showing a vital importance of this protein in cardiac development. Due this fact, hundreds of scientific studies have been carried out only with animals heterozygous (Cx43^{+/-}) compared with the wild-type animals (Cx43^{+/+}). Thus, it was not possible to establish the actual participation of Cx43 in different pathological processes, since the current model does not allow the complete deletion of connexin 43 in different tissues. In this context, this paper proposes the creation of a new model for the study of functional intercellular communication through the production of genetically modified mice, that enabling an adult animal Cx43^{-/-}. For this, a transgene containing an inducible expression system will re-establish intercellular communication through Cx43 gene, and thus avoiding fetal mortality. Using molecular biology techniques is possible to construct vectors for gene expression and validate its functionality by *in vitro* assays and after this validation vectors obtained are transferred into mouse zygotes by pronuclear microinjection technique, hoping to get a mice which in their genome harboring the transgene, in stably way. In this project we can successfully build a system of induced expression of Cx43 gene driven by doxycycline. This system is based on two plasmid vectors, the first one pCx43-Tet3G which is responsible for activating protein rTetR that is sensitive to doxycycline and the second vector pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen who owns the promoter pTRE that is sensitive to rTetR protein, and when activated expresses Cx43, the gene of interest, and the reporter gene ZsGreen. The functionality of the vectors was confirmed by *in vitro* assays using HeLa and E10 cells, where we noticed that the expression is dependent of doxycycline dose, and that the system is very sensitive to the drug, since only 10ng/mL is sufficient to detect the presence Cx43 protein by Western blotting. The next step was *in vivo* experiments, where the vectors were microinjected into pronucleus of mouse zygotes and we got birth rates consistent with those described in the literature, but in almost 200 animals born, none showed positive genotype for the transgene, which was an unexpected result, since the literature describes a success of 3% in transgenesis by pronuclear microinjection. This brief obstacle that we face is already being beat by new techniques that we are doing and we will describe in this manuscript, now we are sure that we will get success and more soon as possible, we will can offer this animal model to the scientific community.

Keywords: Connexin43. Mouse. Animal transgenesis. Microinjection. Inducible gene expression. Tet-On system. Doxycycline.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 As junções comunicantes do tipo gap	18
2.2 As conexinas no desenvolvimento animal	23
2.2.1 As conexinas na gametogênese	23
2.2.2 Os primeiros sinais das conexinas no embrião	28
2.2.3 Conexinas no desenvolvimento embrionário e fetal	31
2.3 A conexina 43	33
2.3.1 O gene Cx43	34
2.3.2 A proteína Cx43	38
2.3.3 Regulação da expressão do gene Cx43.....	44
2.4 Camundongos geneticamente modificados	49
2.4.1 Visão geral	50
2.4.2 Vetores de transgênese	52
2.4.2.1 Promotores de expressão	54
2.4.2.2 Gene de interesse	56
2.4.2.3 Genes repórter	56
2.4.2.4 Gene Tagging.....	59
2.4.2.5 Internal ribosome entry site – IRES.....	61
2.4.2.6 Sinal de Poli-Adenilação.....	63
2.4.3 Tipos de vetores de expressão	63
2.4.4 A tecnologia de produção de camundongos geneticamente modificado.....	66
2.4.4.1 Bases da reprodução murina	66
2.4.4.2 Técnicas de entrega do vetor	70
2.4.4.3 Transgênese por adição.....	75
2.4.4.4 Transgênese por recombinação homóloga	76
2.4.5 Tipos de camundongos geneticamente modificados.....	80
2.4.5.1 Camundongos transgênicos convencionais.	80
2.4.5.2 Camundongos knockout.....	80
2.4.6 Camundongos geneticamente modificados utilizados como modelo de doenças humanas	84
2.5 O sistema de expressão induzido por tetraciclina	88

3 OBJETIVOS	92
3.1 Objetivo geral	92
3.2 Objetivos específicos	92
4 MATERIAL E MÉTODOS	93
4.1 Engenharia dos vetores de expressão gênica	93
4.1.1 Obtenção da sequência codificante do gene Cx43	93
4.1.2 Obtenção da sequência promotora pCx43	94
4.1.3 Clonagem das sequências de interesse	95
4.1.3.1 Sequência do vetor de clonagem TOPO2.1	96
4.1.3.2 Inserção das sequências de interesse ao vetor de clonagem e transformação bacteriana	97
4.1.3.3 Seleção dos clones positivos	97
4.1.4 Construção dos vetores de transgênese	98
4.1.4.1 Construção do vetor pCx43 Tet3G	99
4.1.4.2 Construção do vetor pTRE Cx43-IRES-ZsGreen	101
4.1.4.3 Reação de sequenciamento para verificação das construções	103
4.2 Teste da funcionalidade do sistema Cx43Tet in vitro	104
4.2.1 Cultivo celular	105
4.2.2 Transfecção dos vetores para as células cultivadas in vitro	105
4.2.3 Tratamentos com doxiciclina	106
4.2.4 Imunofluorescência	107
4.2.5 Westernblot	108
4.2.6 PCR em tempo real	109
4.3 Técnicas de transgênese murina	110
4.3.1 Preparação do DNA	110
4.3.2 Animais	111
4.3.2.1 Casais doadores de zigotos	111
4.3.2.2 Obtenção de fêmeas receptoras	112
4.3.3 Obtenção dos zigotos	115
4.3.4 Microinjeção pronuclear	117
4.3.5 Cirurgia de transferência dos zigotos	119
4.3.6 Genotipagem para identificação dos animais transgênicos	123
4.3.6.1 Genotipagem dos animais pCx43-Tet3G	124
4.3.6.2 Genotipagem dos animais pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen	125

4.4 Estratégia de acasalamento para obtenção do modelo transgênico	126
5 RESULTADOS.....	128
5.1 Construção e validação do vetor pCx43Tet3G	128
5.1.1 Amplificação e clonagem da região promotora pCx43	128
5.1.2 Construção do vetor de transgênese pCx43-Tet3G	131
5.1.3 Testes in vitro do vetor pCx43-Tet3G.....	133
5.2 Construção do vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen	137
5.2.1 Amplificação e clonagem da região codificante do gene Cx43.	137
5.2.2 Obtenção e clonagem do gene repórter ZsGreen.	141
5.2.3 Contrução do vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen.....	142
5.3 Validação do sistema Cx43Tet in vitro.	148
5.4 Quantidade e qualidade dos zigotos obtidos	155
5.5 Taxa de nascimento dos animais resultante da técnica de transferência de embrião.	156
5.6 Identificação dos animais geneticamente modificados.....	158
6 DISCUSSÃO	161
7 CONCLUSÕES	168
REFERÊNCIAS.....	169

1 INTRODUÇÃO

Nos organismos multicelulares, as células encontram-se organizadas em tecidos e necessitam estar em contato com as demais para originar grupos cooperativos, que por sua vez estão associados em várias combinações, formando os órgãos. A membrana plasmática é a estrutura celular responsável por esse contato íntimo entre as células vizinhas, portanto, é previsível que esta abrigue diversos tipos de proteínas e estruturas que participem desse contato.

São descritos três tipos distintos de junções celulares, classificadas de acordo com a principal função que desempenham (Alberts et al., 1994). As junções de ancoramento promovem a adesão de uma célula à outra ou a elementos da matriz extracelular; as junções de oclusão são responsáveis pela restrição da passagem de substâncias no espaço intercelular; e as junções comunicantes do tipo GAP, que se organizam formando canais ligando os citoplasmas de duas células vizinhas, permitindo a passagem de substâncias entre as células. Esse último tipo de junção será muito bem discutido neste trabalho.

A necessidade de “diálogo” celular nos tecidos é de extrema importância em diversos estados fisiológicos para sua coordenação e organização. Essa troca de informações entre as células pode ocorrer por meio de moléculas sinalizadoras, como no caso de hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, caracterizando uma comunicação indireta. Em outros casos, a comunicação pode ocorrer através de pequenas moléculas hidrofílicas que transitam diretamente de uma célula vizinha para outra, promovendo a difusão de sinalizadores como íons cálcio e inositol através de canais formados na membrana plasmática.

Essa comunicação direta é feita através de um grupo de proteínas denominadas conexinas, onde a união de seis unidades dessas origina uma estrutura conhecida como conexon. Conexons de duas células adjacentes se unem, formando um verdadeiro túnel por onde passam inúmeras moléculas, sejam elas com carga elétrica ou não, de dimensões compatíveis com o tamanho do canal. Esses canais possuem baixa seletividade, permitindo, de maneira geral, o trânsito livre de moléculas de até 1200Da.

A grande maioria das células animais utiliza a rede de comunicação organizada pelas conexinas. As exceções são os eritrócitos, espermatozóides e células musculares esqueléticas. Essas proteínas são tão importantes na coordenação tecidual que são expressas logo nas primeiras clivagens do embrião, controlando os processos de diferenciação celular logo no início da fase embrionária (Davies, 1996; Houghton, 2002).

A Cx43 é a mais abundante em células de mamíferos, sendo, conseqüentemente, a mais estudada (Dagli, 2004; Yancey, 1989). É expressa em várias células, como nos pneumócitos do tipo II, células ovais hepáticas, endotélio de vasos sanguíneos, miocárdio, fibras de Purkinje, osteoblastos, osteócitos, condrócitos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células de Leydig, mioepitélio mamário, células foliculares da tireóide, células trofoblásticas gigantes, citotrofoblastos e sinciciotrofoblastos.

Em humanos, alterações nos níveis de expressão do gene Cx43, ou mutações, estão relacionadas com diversas doenças e síndromes que acometem milhões de pessoas todos os anos no mundo. Entre essas doenças estão o câncer, doenças cardíacas congênitas, queratodermia palmoplantar, hiperqueratose, e também a Síndrome da Displasia Oculo-Dento-Digital (ODDD). Algumas dessas doenças, como a ODDD são raras, mas diminuem muito a qualidade e expectativa de vida dos afetados, mais que isso, a dificuldade imposta pela ausência de modelos experimentais é uma barreira para o avanço de terapias (Van Steensel, 2005; Vreeburg, 2007).

Uma alternativa para esse problema seria a utilização de animais geneticamente modificados, que podem ser utilizados como modelos experimentais em pesquisas. Como já ocorre em centenas de doenças e síndromes, animais transgênicos são utilizados da pesquisa básica à pesquisas aplicadas, como aquelas que versam sobre terapêuticas farmacológicas, testes pré-clínicos e terapias gênicas (Chaible, 2010).

Um possível modelo de pesquisa seriam os camundongos knockouts para o gene Cx43 que Reaume et al. (1995) produziram. Esses animais tiveram o gene conexina 43 inativado por meio de técnicas moleculares, baseando-se no princípio da recombinação homóloga. Porém esse modelo mostrou-se inviável num primeiro

momento, pois os animais que apresentavam ausência total do gene (Cx43^{-/-}) morriam logo após o nascimento devido a malformação cardíaca.

Num segundo momento os animais hemizigotos (Cx43^{+/-}) mostraram-se de grande valor. Esses animais não apresentavam o mesmo fenótipo letal, e foram utilizados em muitos estudos para compreensão dos efeitos da redução da expressão do gene Cx43 em doenças cardíacas e circulatórias (Liao, 2001; Ya, 1998), câncer (Avanzo, 2004; Mclachlan, 2007) diabetes (Bajpai, 2009), arteriosclerose (Pfenniger, 2013), doenças de pele (Avshalumova, 2013) e doenças autoimunes (Brand-Schieber, 2005; Green, 1996).

O modelo de Reaume et al. (1995) foi utilizado em mais de 300 diferentes trabalhos anexados ao banco de dados do NCBI, e o trabalho original dos autores possui aproximadamente 850 citações (Web of Knowledge). Esses dados evidenciam a busca de grupos de pesquisa do mundo todo por um modelo transgênico para a Cx43. O gene Cx43 também está cada ano mais em foco, há um aumento ano após ano no número de trabalhos que o estudam ou de alguma forma o abordam, segundo o NCBI nos últimos 10 anos praticamente dobrou o número de publicações com esse tema, sendo 231 em 2002 e 437 em 2012.

Baseando-se nessa perspectiva, e também pela necessidade do nosso grupo por um modelo adequado, decidimos nos enveredar num audacioso projeto, que objetivava a obtenção de um modelo inédito de expressão condicional do gene Cx43 que não possuísse o fenótipo letal quando completamente inativado.

Ao longo das páginas daremos um melhor embasamento científico para o leitor, ilustrando tópicos pertinentes como a estrutura do gene de interesse Cx43, o método de expressão induzida que escolhemos e como nossos animais poderão servir como modelo de estudos de doenças humanas no futuro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As junções comunicantes do tipo gap

As junções comunicantes do tipo gap (*Gap Junctional Intercellular Communication* GJIC) foram descritas pela primeira vez no final dos anos 60. O termo “junção comunicante do tipo *gap*” é utilizado com a finalidade de descrever regiões especializadas das membranas plasmáticas de duas células adjacentes que se reaproximam sem se fundir, delimitando um espaço intermembranas ou “gap” estimado em 2-3 nm. A observação em microscópio eletrônico mostrou que as GJIC apresentam dispostas na forma de placas, formando assim regiões de comunicações.

Essas regiões das membranas nas quais se detectou comunicação entre as células foram definidas por Makowski et al. (1977), caracterizando um modelo que ainda é atual, em que cada placa é composta por vários canais intercelulares constituído pela associação de estruturas hexaméricas de 7 nm de diâmetro chamadas de *conexons* (Figura 1B). Cada *conexon* é constituído de seis subunidades protéicas que atravessam a membrana: as *conexinas* (Cx), que quando oligomerizadas formam um poro central hidrofílico de cerca de 2 nm de diâmetro (Figura 1B).

Figura 1- Ilustração das conexinas (A) Estrutura da conexina mostrando os 4 domínios transmembranares, uma grande alça intracelular, duas alças extracelulares e uma grande calda na porção carboxi-terminal. A união dessas seis proteínas formam um connexon. (B) Modelo de organização da placa juncional proposta por Makowski et al. (1977) estabelecida a partir de estudos de microscopia eletrônica e de estudos de difração de raios X de junções gap no fígado de camundongos. Cada connexon (círculo vermelho) é formado por seis subunidades de conexinas (representadas em amarelo/azul) delimitando um poro central (em rosa) e está estritamente associado a outro connexon na membrana adjacente (retângulo verde).

A nomenclatura correntemente utilizada e aceita pela comunidade científica faz referência ao tamanho da proteína (em kDa), precedida do termo genérico Cx (BEYER et al., 1987). Em certos casos, algumas conexinas identificadas apresentam massas moleculares muito próximas, sendo necessário o emprego de um número decimal: é o caso para diferenciar a conexina 31 da conexina 31.1 (Hennemann, 1992; Willecke, 1991).

Existe ainda uma nomenclatura alternativa, que é baseada na análise filogenética das diferentes conexinas, isto é, baseada nas homologias das seqüências de nucleotídeos (Kumar, 1992). Esta classificação agrupa todas as conexinas em três grupos distintos: grupos α , β e γ conforme ilustrado na figura 2. Nesta nomenclatura, cada Cx é nomeada pelo desígnio Gj (*Gap Junction*), identificada pela classe na qual ela pertence (α , β ou γ), seguido do número da ordem de sua identificação. Por exemplo, a Cx43 aparece na classe α e foi a primeira conexina identificada nesta classe, assim, ela também pode ser identificada como Gj α 1 (Bennett, 1991; O'Brien, 1998).

Figura 2- Divisões filogenéticas das diferentes isoformas das conexinas (Cx), de acordo com a classe. Família multigênica derivada de um ancestral comum. Adaptado de Avanzo (2004).

A grande maioria das células animais utiliza a rede de comunicação feita pelas conexinas, com exceções dos eritrócitos, espermatozóides e células musculares esqueléticas. Segundo Willecke et al. (2002) foram identificadas 19 isoformas, estando todas amplamente distribuídas pelos tecidos. O quadro 1 relaciona as principais conexinas com seus locais de expressão em mamíferos.

Quadro 1- Relação das principais conexinas com os tecidos que são naturalmente expressas.

Conexina	Células/Tecidos/Órgãos
Cx26	Hepatócitos, células secretoras das glândulas endócrinas e exócrinas, determinados queratinócitos, determinadas células epiteliais
Cx30	Cérebro e queratinócitos
Cx30.3	Células dos blastocistos; determinados queratinócitos
Cx31	Determinados queratinócitos; células dos blastocistos; células da trofoectoderme placentária; rins
Cx32	Maioria dos epitélios; hepatócitos; células secretoras das glândulas exócrinas; epitélio folicular da tireóide; rins; determinados neurônios; oligodendrócitos; células de Schwann
Cx33	Algumas células do testículo
Cx36	Neurônios
Cx37	Determinadas células endoteliais; determinados queratinócitos; células musculares cardíacas; estômago; testículo; ovário;
Cx40	Determinadas células endoteliais; célula dos blastócitos; células do sistema de condução cardíaca;
Cx43	Epitélio do cristalino e da córnea; osteócitos; astrócitos; leptomeninges; leucócitos; macrófagos; células musculares cardíacas; trofoblastos; células musculares lisas; células secretoras das glândulas endócrinas; células β pancreáticas; células de Leydig; células de Sertoli; células tireoidianas; determinados queratinócitos; blastócitos; fibroblastos.
Cx45	Células musculares cardíacas; células dos blastócitos; células epiteliais do pulmão, dos rins, do intestino; do cérebro; determinados queratinócitos; osteócitos
Cx46	Fibras do cristalino; células musculares; células de Schwann; coração; rins; osteócitos
Cx49	Cristalino
Cx50	Fibras do cristalino e córnea
Cx57	Coração, pulmão, pele, rins, ovários, testículos, intestino
Cx60	Teca interna e células cúmulos no ovário. cólon, timo, baço

Relação das principais conexinas conhecidas em mamíferos e seus locais de expressão.

Fonte: Adaptado de Avanzo, 2004

Muitas células expressam mais de um tipo de Cx, formando *conexons* com constituições diferentes e características próprias. Como demonstra a figura 3, um *conexon* é homomérico se composto de um único tipo de conexina ou que ele é heteromérico se ele é composto por diferentes tipos de conexinas. Por sua vez, os canais intercelulares podem ser constituídos a partir de combinações diferentes de *conexons* homoméricos ou heteroméricos. A associação de dois *conexons* idênticos leva a formação de um canal homotípico enquanto que o alinhamento de dois *conexons* diferentes forma um canal heterotípico.

A existência de *conexons* heteroméricos foi observada *in vitro* e confirmada *in vivo*. Diferentes combinações foram descritas: Cx32/Cx26 no fígado (Diez et al. 1999) e na glândula mamária (Berthoud et al., 2000), Cx40/Cx43 no músculo liso (He et al., 1999). Ou ainda Cx45.6/Cx50 no cristalino (Jiang, 1996). Hoje em dia, a existência *in vivo* de canais heterotípicos formados de *conexons* heteroméricos ainda não foi demonstrado.

Figura 3- Ilustração das possibilidades de arranjos entre duas conexinas na formação dos conexons e dos conexons em um canal comunicante.

Conexons homoméricos formados pela Cx43 permitem a passagem de moléculas de até 1.2 KDa, preferencialmente de carga negativa. Por esses canais, moléculas como cAMP, derivados do inositol trifosfato (IP3) e Ca^{2+} , passam

livremente por citoplasmas de células adjacentes. Os canais formados pela Cx45 por outro lado, possuem um poro de menor tamanho se comparado com a Cx43, o que altera o perfil de moléculas beneficiadas, permite a passagem de moléculas de até 0.3 KDa, preferencialmente de carga positiva (Niessen, 2000; Stains, 2005).

2.2 As conexinas no desenvolvimento animal

Como já discutido, as conexinas são as principais proteínas que constituem as junções comunicantes. Essas junções formam poros que facilitam a difusão de mensageiros celulares que coordenam processos de proliferação e diferenciação celular (De Sousa, 1993). Essa facilitação no transporte de mensageiros está presente desde os primeiros estágios do embrião até o final da vida do indivíduo, e qualquer alteração nesse processo influencia na correta homeostasia tecidual.

2.2.1 As conexinas na gametogênese

As junções do tipo *gap* se mostram importantes antes mesmo da fecundação do oócito. Durante o desenvolvimento do folículo e maturação do gameta feminino, as conexinas estão presentes no complexo cúmulos-oócito, facilitando a passagem de sinalizadores e coordenando a diferenciação dessas células. No folículo ovariano de roedoras estão presentes as isoformas Cx26, Cx32, Cx37, Cx43 e Cx45, sendo a Cx43 a mais abundante nas células da granulosa, com expressão aumentada em resposta ao hormônio folículo estimulante (*Follicle-stimulating hormone*, FSH), e diminuída na presença do hormônio luteinizante (*Luteinizing hormone*, LH) (Bevans, 1998; Simon, 2006; Wiesen, 1993).

A Cx37 facilita o diálogo da zona pelúcida com o oócito e também possui sua expressão alterada conforme o estágio de desenvolvimento do folículo (Kidder, 2002). A disposição das conexinas está ilustrada na figura 4.

Figura 4- Ilustração esquemática da disposição das conexinas no folículo ovariano de fêmeas de camundongos. A Cx37 é encontrada somente na zona pelúcida, comunicando-se com a membrana do oócito; a Cx43 é encontrada nas células do cúmulo. Nas projeções transzonais das células do cúmulo com oócito a Cx37 faz ligações heterotípicas com a Cx43

Fonte: (adaptado de Simon, 2006; Kidder, 2002).

A importância da proteína Cx43 no desenvolvimento folicular é evidenciada em trabalhos realizados utilizando animais *knockouts* para esse gene. Observa-se que os animais Cx43^{-/-} possuem um atraso acentuado na maturação do folículo, muito provavelmente pela dificuldade da dissipação da sinalização celular causada pela ausência dos canais. A figura 5 ilustra morfologicamente este atraso da maturação folicular (Kidder, 2002)

O hormônio FSH, ao ligar-se com seus receptores, aumenta o cAMP intracelular através da Adenil ciclase, desencadeando a cascata de transdução do sinal por todas as células. Segundo Ackert et al (2001), o motivo mais provável pela incapacidade de crescimento e diferenciação das células da granulosa e, por consequência, o não desenvolvimento do folículo, é causado pela dificuldade da disseminação do cAMP nas célula Cx43^{-/-} (Bevans, 1998).

Figura 5- Folliculogênese anormal em ovários de fêmeas com deleção do gene Cx43. Devido os animais Cx43^{-/-} morrerem logo após o nascimento, os ovários de fêmeas com 19 dias de gestação foram transplantados para outros animais para que o órgão continuasse do desenvolvimento. Após 3 semanas os ovários foram retirados e os folículos cultivados *in vitro*. Folículos cultivados, de mesma idade, foram comparados; nos que possuem a ausência da Cx43 (B), o folículo se encontra na fase pré-antral, refletindo a falha da expansão das células da granulosa; enquanto os animais com expressão normal do gene se desenvolveram de maneira normal (A)
Fonte: (ACKERT, 2001).

Ao contrário dos animais Cx43^{-/-}, os animais com deleção total do gene Cx37 sobrevivem ao desenvolvimento fetal e são adultos viáveis. Estudos feitos com animais Cx37^{-/-} demonstraram que as fêmeas são inférteis devido à incapacidade de seus folículos se desenvolverem após a fase pré-antral. Os folículos são recrutados normalmente mas ocorrem falhas em seu crescimento e desenvolvimento, entrando em atresia e formando estruturas similares ao corpo lúteo (Simon, 1997).

O espermatozóide é uma das poucas células em que, até hoje, não foram encontradas conexinas. Apesar desse fato, essas proteínas afetam diretamente a produção dos espermatozoides, pois são encontradas no tecido testicular, como nas células de Leydig, espermatogônias e células de Sertoli. A relação das conexinas encontradas nas células do tecido testicular de camundongos, bem como o modo de detecção utilizado, está descrito no quadro 2.

Quadro 2- Relação das diversas conexinas encontradas nos tecidos testiculares de camundongo e as técnicas de identificação

Conexina	Tipo de célula testicular
Cx26	Espermatócito e Espermátides: Compartimento apical dos túbulos seminíferos
Cx30.2	Células de Leydig e endotélio
Cx32	Espermatócitos, Espermátides e células de Sertoli: Compartimento apical dos túbulos seminíferos
Cx33	Células de Sertoli: Espermatócito e Espermátides
Cx43	Células de Sertoli e de Leydig: Células peritubulares
RT-PCR: <i>Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction</i> ; IH: Imunohistoquímica; WB: <i>Western Blot</i> . As técnicas relacionadas se referem à molécula encontrada, mRNA ou proteína Fonte: (Pointis, 2005).	

Através do estudo de animais *knockouts* (KO), é possível verificar a importâncias dessas proteínas na espermatogênese. Alguns animais, apesar da deleção do gene de determinada conexina, apresentam o processo normal de espermatogênese, com fertilidade normal. É o caso dos animais KO Cx31 (Plum, 2001), KO Cx32 (Nelles, 2006), KO Cx37 (Simon, 1997), KO Cx46 (Gong, 1997), KO Cx47 (Odermatt, 2003) e KO Cx50 (White, 1998).

A deleção completa do gene da Cx43 acarreta na falha do desenvolvimento do testículo ainda na fase fetal e também na adulta. Esta proteína promove a comunicação entre as células de Sertoli, entre essas células e espermatogônias ou espermatócitos imaturos. Sua expressão é alterada conforme o nível de FSH, variando a permeabilidade da membrana e regulando a passagem de íons Ca^{++} , essenciais para a transdução de sinais via cAMP. Dessa forma, a ausência da Cx43 acarreta uma comunicação deficiente, impossibilitando que a célula receba a sinalização de moléculas importantes para seu desenvolvimento normal (Pointis, 2005).

Alguns trabalhos indicam que a Cx43 participa ativamente na regulação da espermatogênese: (1) Formação de contatos entre as células de Sertoli e células germinativas em proliferação através da Cx43 sugere sua participação em etapas

específicas da espermatogênese (Decrouy, 2004); (2) Os níveis de Cx43 no túbulo seminífero são reduzidos ou praticamente inexistentes em animais mutantes que não apresentam espermatogênese (Batias, 1999); (3) A expressão da Cx43 está fortemente associada com o desenvolvimento das células germinativas dos túbulos seminíferos (Batias, 1999; Risley, 1992).

Alguns camundongos tiveram o gene da Cx43 deletado somente nas células de Sertoli através do sistema Cre-loxP, assim as demais células eram normais, evitando a letalidade fetal. Esses animais SC-Cx43 KO foram estudados para o melhor entendimento dessa proteína na espermatogênese e desenvolvimento do testículo, concluindo que: (1) A Cx43 está envolvida no controle de proliferação e maturação das células de Sertoli, figura 6; (2) Os efeitos encontrados acarretam mudanças sistêmicas, que por consequência afetaria a proliferação dessas células, mas sim diretamente em genes que regulam especificamente a divisão celular das células de Sertoli (Sridharan, 2007)

Figura 6- Comparação dos testículos de camundongos de mesma idade. A redução do tamanho testicular do animal SC-Cx43 KO é facilmente percebida quando comparada com o animal normal. A diferença é devido problemas na proliferação e diferenciação celular. Barra de escala: 1mm
Fonte: (Sridharan, 2007).

2.2.2 Os primeiros sinais das conexinas no embrião

Durante os primeiros estágios do desenvolvimento animal, o zigoto ainda é uma pequena massa celular não compactada, formado por poucas células totipotentes, as quais se movem livremente dentro da área delimitada pela zona pelúcida (Fink, 1991). Essa morfologia apenas será alterada depois das primeiras clivagens, pois genes e proteínas relacionados com a adesão e comunicação celular serão ativados, formando uma massa compacta, dando origem às primeiras alterações embrionárias, entre elas a formação do trofoblasto e da massa celular interna (Damsky, 1993).

Segundo Prather e First (1988), embriões de camundongos iniciam a transcrição de seu DNA genômico 18 horas após a fecundação, ainda no estágio de duas células. A compactação ocorre no estágio de oito células (48h) e chegam ao útero 60 horas depois da fecundação, possuindo 16 células. A fase de blastocisto é alcançada com 78 horas, eclodindo da zona pelúcida poucas horas depois, pronto para prosseguir com a implantação.

As proteínas responsáveis pelas junções do tipo *gap*, as conexinas, estão presentes logo após a ativação genômica do animal, sendo que algumas como a Cx31 e Cx43 possuem mRNA antes mesmo dessa fase. (Bloor, 2004). A proteína Cx43 em particular é encontrada no citoplasma na fase de 4 células e, no estágio seguinte, já na membrana plasmática dos blastômeros (De Sousa, 1993).

Até a fase pré-implantação do embrião foram detectados transcritos de 8 isoformas de conexinas, sendo que das Cx26, Cx31, Cx31.1, Cx43, Cx45 foram identificadas proteínas funcionais, formando junções comunicantes entre as células. Dessas 8 isoformas identificadas, somente a Cx31 e Cx43 são amplamente encontradas no embrião, tanto nos trofoblastos quanto na massa celular interna (Bloor, 2004).

A Cx43 é sem dúvida a isoforma mais abundante encontrada no embrião, facilitando a comunicação entre as células na massa celular interna e dos trofoblastos. Sua presença é detectada no estágio de 4 células e cada vez mais abundante nas células, como ilustrado na figura 7.

Figura 7- Através da microscopia confocal é possível observar a marcação por Imunohistoquímica para Cx43 em embriões de camundongos de diversas idades. (A) embrião no estágio de 4 células; as setas indicam as marcações, visivelmente localizadas no citoplasma dos blastômeros. (B) Embrião no estágio de 8 células, iniciando a sua compactação; as setas cheias indicam as placas juncionais em que a Cx43 está presente, enquanto as setas vazias indicam as proteínas ainda no citoplasma, notadamente mais difusas que na situação A. (C) Embrião no estágio de Mórula, com a Cx43 amplamente distribuída. (D) Embrião em estágio de Blastocisto; a Cx43 está presente tanto na massa celular interna (ICM) quanto no trofoblasto (T). bl: blastocele
Fonte: (De Sousa, 1993).

A Cx43 tem um papel fundamental no desenvolvimento do embrião, seja na compactação, na coordenação da diferenciação de células da massa celular interna e do trofoblasto ou na implantação uterina (De Sousa, 1993; Valdimarsson, 1995).

Devido a sua grande importância no desenvolvimento embrionários, era de se esperar que os embriões com deleção do gene da Cx43 tivessem insucesso no desenvolvimento e morte ainda nessa fase. No entanto, eles conseguem se

desenvolver de maneira “normal”, morrendo apenas após o nascimento devido problemas cardíacos (Reaume, 1995; Ya, 1998). Na ausência da Cx43, ocorre uma compensação na comunicação intercelular por outras isoformas das conexinas, tais como Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx40 e Cx45, favorecendo o desenvolvimento do animal (Davies, 1996; Houghton, 2002).

Apesar de haver a compensação da comunicação por outras isoformas das conexinas, indícios sugerem que existem alterações na seletividade de mensageiros que passam pelos canais. Na ausência da Cx43, a Cx45 forma canais heterotípicos ou heteroméricos alterando a permeabilidade dessas células, e por consequência, alterando o perfil das moléculas que passam por ele (De Sousa, 1997).

Apesar da Cx43 ser mais abundante que a Cx45, em muitas placas juncionais ocorre a presença de ambas conexinas. Possivelmente a co-expressão delas em algumas células esteja relacionada com processos de diferenciação distintos. A figura 8 ilustra a localização das Cx43 e Cx45 no estágio de mórula do embrião.

Figura 8- Microscopia confocal mostrando a localização das Cx45 e Cx43 em embriões no estágio de mórula. (A) imunomarcação em vermelho para Cx45; (B) dupla imunomarcação para Cx45 e Cx43. Em verde a localização da Cx45 e em amarelo a co-localização das Cx45/43. Barra de escala: 25µm
Fonte: (Bloor, 2004).

2.2.3 *Conexinas no desenvolvimento embrionário e fetal*

Ao final dos primeiros dias de desenvolvimento, o embrião de camundongos se infiltra na mucosa uterina, onde dará continuação ao seu desenvolvimento. Nessa fase de blastocisto existem dois grupos de células distintas: massa celular interna e trofoblasto. As primeiras diferenciações ocorrem em tecidos primitivos, iniciando o processo de gastrulação, do qual surgem os primeiros tecidos primitivos: epiblasto e hipoblasto, também denominados ectoderma e endoderma primitivos, respectivamente (Gilbert, 1994; Moore, 2004).

O epiblasto é um tecido primitivo derivado da massa celular interna que prolifera rapidamente, resultando no epiblasto embrionário e no extraembrionário; do primeiro irá se originar os folhetos embrionários e, por consequência, todas as células do futuro feto. O segundo formará o âmnio e seu fluido. O hipoblasto constitui a camada inferior da antiga massa celular interna, imediatamente abaixo do epiblasto, e a proliferação de suas células originará a camada interna do saco vitelínico (Gilbert, 1994; Moore, 2004).

Durante a gastrulação, as células do trofoblasto se infiltram no endométrio uterino, diferenciando-se em células do citotrofoblasto e do sinciotrofoblasto. Por sua vez, estas células somadas com o mesoderma extraembrionário (originado pelo epiblasto extraembrionário) formará o córion, que combinado com as células do endométrio formará o órgão chamado placenta (Gilbert, 1994; Hogan, 1986).

Nesse processo complexo, as conexinas participam ativamente na coordenação da disseminação de sinais, possibilitando a passagem de mensageiros celulares, controlando a polaridade celular, pH, Ca^{++} intracelular e fosforilação (Melassiné, 2005).

Com 5.5 dias após coito (dpc) a Cx43 é identificada em ambos tecidos primitivos, mas não de forma abundante, predominantemente no endoderma, sendo que esse não contribuirá para a formação do feto. O aumento do número de células que expressam Cx43 ocorre no momento do surgimento das porções embrionárias e extraembrionárias, derivados do hipoblasto, sendo nesse último o sinal mais intenso (Yancey, 1992).

No início do 8º dpc, o processo de gastrulação já está em estágio avançado e a Cx43 é visivelmente encontrada nos três folhetos germinativos, aumentando tanto o número de células que a expressa, quanto em quantidade. A região mais rica é sem dúvida o ectoderma, que futuramente originará a placa neural. A figura 9 mostra claramente a marcação e suas regiões.

Figura 9- Embrião de camundongo com 17,5dpc em corte longitudinal. As Figuras 9A e 9B são as regiões indicadas na caixa inferior em maior aumento em microscopia confocal. (A) Região anterior. A Cx43 está distribuída no ectoderma (ec) incluindo a região da dobra cranial (hf). Eles estão interconectados com a linha do intestino primitivo (f), formada por células endodérmicas. A mesoderme (m) com exceção do coração primitivo (h) é negativa para Cx43. (B) Região Posterior. Assim como todas as regiões do embrião, o ectoderma contém numerosas ligações do tipo gap através da Cx43. Essas ligações unem as células do mesoderme, incluindo os que estão formando os somitos (s).
Fonte: Yancey, 1992.

A transformação do embrião em feto é gradual, durante a organogênese, a expressão da Cx43 torna-se mais localizada, sendo encontrada principalmente nos órgãos primitivos e regiões específicas do cérebro em desenvolvimento e tubo neural. Nesse período de desenvolvimento, inicia-se o padrão de expressão definitivo das conexinas nos tecidos. (Buniello, 2004; Yancey, 1992).

É de fundamental importância o conhecimento da localização de expressão das isoformas e também da expressão simultânea de várias conexinas no mesmo tipo celular, pois esses fatores estão diretamente relacionados com diversas síndromes (White, 1999).

Figura 10- Fotomicrografia da hibridização in situ para mRNA da Cx43 em fetos com 14.5 dpc. É possível compreender a extensão da expressão desse gene e a atuação dela na comunicação celular de muitos tecidos. (A) Corte longitudinal na linha medial do feto, mostrando as regiões positivas como coração e medula espinhal (setas amarelas) e regiões negativas, ossos da face (seta vermelha). (B) Corte longitudinal distanciado 1mm da linha medial, lado direito. As regiões positivas como pulmão e costelas (setas amarelas); e a região negativa o fígado (seta vermelha)
Fonte: Genepaint, 2008

2.3A conexina 43

A conexina 43 (Cx43) é a isoforma mais abundante encontrada em tecido de mamíferos, sendo assim a mais importante e mais estudada dentre elas (Mass, 2004; Willecke, 1990). A Cx43 é encontrada em mais de 34 tecidos e 46 tipos celulares, entre elas os pneumócitos do tipo II, células ovais hepáticas, endotélio de vasos sanguíneos, miocárdio, fibras de Purkinje, osteoblastos, osteócitos, condrócitos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células de Leydig, mioepitélio mamário, células foliculares da tireóide, células trofoblásticas gigantes, citotrofoblastos e sinciotrofoblastos.

Neste tópico iremos discutir assuntos importantes relacionados com a Cx43, como sua estrutura gênica, mecanismos de regulação da sua expressão gênica, migração e degradação.

2.3.1 O gene Cx43

O gene da Cx43, também conhecido como Gja1, está localizado no cromossomo 10 murino (*Mus musculus*), na posição 10B4, 56.377.300–56.390.419 (figura 11A). Como ilustrado na figura 11B, o gene possui aproximadamente 13.000 pares de bases e é constituído por duas regiões codificantes (exons), sendo que o transcrito possui 3.055 bases. Em humanos, esse gene está localizado no cromossomo seis, mas possui grande homologia com o murino (Genebank, 2013).

Apesar do gene Cx43 ser transcrito praticamente de forma ubíqua nas células do camundongo, ele está inserido numa região com pouco genes presentes, e com baixa atividade transcricional. Na região de 1Mb que cerca o gene Cx43 apenas outros 7 genes são encontrados, muito diferente da região localizada à 20Mb downstream que possui quase uma centena de genes transcritos (figura 11C).

Os exons possuem alta homologia entre as espécies animais, principalmente entre os mamíferos. Alguns códons são extremamente conservados entre todas as espécies e por consequência os aminoácidos traduzidos na proteína. São exatamente nesses códons que mutações estão sendo correlacionadas com alterações fenotípicas em humanos, entre elas a Síndrome da Displasia Oculo-Dento-Digital (figura 12) (Paznekas, 2003).

Figura 11- Ilustrações das características do gene Cx43. (A) Ideograma do cromossomo 10 ilustrando o padrão de bandeamento com a identificação de cada uma delas, a seta vermelha ilustra a localização do gene Cx43. (B) Ilustração ampliada da região que o gene Cx43 está localizado no cromossomo 10. No mapa é possível observar todos os contigs depositados no GeneBank, bem como as regiões de leitura, as regiões codificantes e não traduzidas inseridas no mRNA. (C) Ilustração do cromossomo 10 com o gene Cx43 identificado (Gja1) ao centro e os genes que os cercam. É possível observar que o gene de interesse está localizado numa região de baixa atividade gênica se comparado com as regiões que o flaqueia.

Fonte. GeneBank, 2013

		Amino Acid at Connexin 43 Number																
Accession no.	Protein (connexin) species	17	18	21	22	23	40	49	52	76	90	98	102	130	134	138	202	216
gi:4504001	GJA1 (Cx43) human	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:6753992	Gja1 (Cx43) mouse	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:117708	Gja1 (Cx43) rat	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:117704	gja1 (Cx43) bovine	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:482508	gja1 (Cx43) chicken	Y	S	G	G	K	A	H	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:17939336	gja1 (Cx43) Gallus gallus	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:117709	gja1 (Cx43) Xenopus laevis	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:16024889	gja1 (Cx43) Silurana tropicalis	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:10717217	gja1 (Cx43) Cyprinus carpio	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:2921388	gja1 (Cx43) Danio rerio	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	I	K	G	R	V
gi:3192831	gja1 (Cx43) Danio aequipinnatus	Y	S	G	G	K	A	Q	F	R	L	Y	K	N	E	G	R	V

Figura 12- Quadro ilustrativo dos aminoácidos conservados nas diferentes espécies animais.

Adaptado de PAZNEKAS, 2003

A análise da estrutura do gene Cx43 no GeneBank nos revela que o exon1 possui pouco mais de 170 bases, pertencendo totalmente à região 5'-UTR (região não traduzida), enquanto o exon2 possui aproximadamente 2.880 bases, contendo toda a região decodificadora da proteína. Entre os dois exons o gene possui uma grande região intrônica de aproximadamente 30Kb.

Porém trabalhos que se aprofundaram nos estudos do gene verificaram que a distância que separa os éxons 1 e 2 de camundongos é de 10.5Kb. Essa discrepância de quase 20Kb é relacionada com uma nova estrutura proposta. Recentemente, a estrutura de gene que codifica para a Cx43 de camundongos foi redefinida identificando nove novas espécies de mRNA da Cx43 (GeneBank NM010288, e AY427554 a AY427561) produzidos pela utilização de mecanismos de splicing alternativos (Pfeifer et al., 2004).

Tal trabalho identificou três promotores alternativos e seis diferentes éxons e revelou a intrincada regulação do gene da Cx43 nos diferentes níveis: transcrição, splicing do pré-mRNA e na tradução. Este trabalho revelou a possibilidade de alguns órgãos utilizarem promotores específicos. Essa nova visão sobre o gene levou à descoberta de mecanismos de controle pós-transcricionais, como por exemplo, a transcrição do exon1E causa o bloqueio na tradução. Adiante discutiremos a fundo esse processo regulatório, por hora, a nova divisão do gene Cx43 e os splicings alternativos estão ilustrados na figura 13.

Pfeifer et al. ainda revelaram que diferentes tecidos possuíam um padrão diferente de mRNA, compostos por exons diferentes em combinações diferentes, porém em todos os transcritos estava presente a integridade do exon2 responsável pela região codificante da proteína (figura 13B-C)

Figura 13- Identificação das 6 novas regiões Cx43 5'-UTRs em camundongos. (A) Diagrama mostrando organização genômica dos novos éxons da Cx43, e as combinações dos splicing alternativos encontrados. P1, P2 e P3 promotores identificados que são “utilizados” de acordo com a disponibilidade de fatores de transcrição do tecido. L = large; s = small; ATG = start códon. UTR: Sequência não traduzida. (B) Fotografia do gel de agarose que analisou a presença dos diferentes exons em diferentes tecidos. H: Coração; U: Útero; B: Cérebro; MG: Glândula mamária; Li: Fígado; Lu: Pulmão. (C) Diferentes transcritos do gene Cx43 encontrados nos diferentes tecidos analisados.

Adaptado de Pfeiter et al. (2004)

2.3.2 A proteína Cx43

A proteína Cx43 é constituída por 382 aminoácidos distribuídos em 4 domínios transmembranares (TM) que servem como ancoragem na célula, duas alças extracelulares (EC), uma alça intracelular (CL) e uma calda residual na região N-terminal (NT) e outra maior na região C-terminal (CT) (figura 14A). Em cada uma das duas alças extracelulares estão presentes três aminoácidos cisteínas que são responsáveis pela ancoragem entre os dois hemicanais justapostos em cada uma das células (figura 14A – identificado em vermelho) (Stains, 2005).

A alteração na sua constituição química e consequentemente estrutural está relacionada com doenças e síndromes. Alguns aminoácidos já são sabidamente cruciais para o fenótipo afetado na síndrome ODDD, e esses estão ilustrados na figura 14B nas letras em azul (Stains, 2005).

As alterações descritas na proteína estão relacionadas com mudanças na estrutura terciária da molécula, o que acarreta mudanças na permeabilidade da junção do tipo gap, algumas vezes até tornando-a não funcional (Paznekas, 2003). Algumas mudanças são ainda mais críticas, pois impedem o correto processamento pós-traducional, migração ou degradação da proteína (Huang, 2003)

A correta funcionalidade da proteína Cx43 está relacionada com uma intrincada rede de sinalização celular e modificações pós traducionais que fazem com que a molécula migre para a membrana plasmática onde ficará agregada à outras seis subunidades formando o conexon. A estrutura de uma subunidade da Cx43 está ilustrada na figura 15A-B, e o complexo de seis subunidades agregadas denominado conexon ilustrado na figura 15C-D.

Este intrincado processo inicia-se logo após a transcrição do mRNA, essa molécula é levada ao retículo endoplasmático e depois da tradução migrará para o aparato de Golgi. Na região trans-Golgi cada subunidade é agregada a outras formando o complexo conexon. A ativação da migração desse complexo é dependente de Proteínas Kinases (PKA e PKC), assim como seu funcionamento, permeabilidade e degradação. Esse processo de fosforilação ocorre em diferentes regiões e aminoácidos como forma de sinalização celular para atividade da proteína (Solan, 2009).

A maior parte das fosforilações encontradas na Cx43 estão localizadas nos aminoácidos Tirosina (Y) e Serina (S). Algumas fosforilações estão diretamente relacionadas com atividades específicas, por exemplo: Fosforilação nos aminoácidos Y247, Y265, S262, S279 causam diminuição do processo de ativação da comunicação celular; fosforilação no aminoácido S364/365 são importantes para a formação das placas juncionais; e a fosforilação dos aminoácidos S365 e S368 está relacionada com processos de evitar hipóxia celular (Sola, 2009).

Figura 14- A proteína Cx43. (A) Ilustração estrutural da cx43 com os quatro domínios transmembranares (TM), alça extracelular (EC), alça intracelular (CL) e as caudas residuais N-terminal (NT) e C- terminal (CT). Os aminoácidos marcados em azul estão relacionados à mutações causadoras da ODDD, os seis aminoácidos marcados em vermelho são cisteínas responsáveis pela ancoragem dos conexons justapostos, e os aminoácidos identificados em verde e laranja são responsáveis por fenótipos específicos de ODDD, como fenótipo em hiperqueratose. (B) Descrição química da Cx43 com os mesmos aminoácidos identificados na figura A. as regiões sublinhadas indicam as os domínios transmembranares.

Figura 15- Ilustração das estruturas tridimensionais da proteína Cx43. (A-B) Estrutura das subunidade Cx43 predita pelo software PhosphoSite vista em duas perspectivas diferentes. (C-D) A agregação de seis subunidades formam um complexo proteico denominado conexon que forma um canal na membrana celular.

Apesar de termos processos específicos de fosforilação como descrevemos anteriormente, atribui-se a graus de fosforilação determinadas atividades. Usualmente relacionamos a Cx43-P₁ (uma fosforilação) com a migração para a membrana celular e a Cx43-P₂ (duas fosforilações) com a formação das placas comunicantes na membrana (Berthoud, 2003; Musil, 1994).

As Cx43-P₁ localizada no aparato de Golgi são englobadas por vesículas de transporte e migram para a membrana plasmática, ao chegar à membrana formam

placas com milhares de conexons que podem estar ativos (abertos) ou inativos (fechados). A ativação desses canais depende de processos de proteínas MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) na fosforilação da Tirosina Y265 ou da Serina S238 (Berthoud, 2003).

A meia-vida da Cx43 é de aproximadamente cinco horas, evidenciando o intenso processo de síntese e degradação dessa proteína. As proteínas que estão inseridas na membrana plasmática após esse período recebem uma sinalização, geralmente pelo processo de ubiquitinação na Y286, o que é interpretado pela célula como um sinal de internalização daquela região da membrana plasmática, formando um conexossomo e degradado por enzimas lisossomais (Berthoud, 2003). A figura 16 ilustra o processo de síntese e degradação da Cx43.

As conexinas estão frequentemente associadas a outras proteínas do complexo de adesão celular, entre elas as β -cateninas, E-caderinas, ZO-1 e ZO-2, todas elas formando um complexo sistema que colabora para a manutenção da células justapostas e sua comunicação para coordenação das atividades teciduais (Vinken, 2012).

A Cx43 interage com as β -cateninas como mecanismo de ativação do crescimento e morte celular mediando a coordenação em células adjacentes. A Cx43 ainda liga-se com as proteínas ZO-1 e ZO-2 (Zonula occludens) interagindo com fatores de transcrição que regula a expressão de genes relacionados com a manutenção da homeostase celular. Esse intrincado complexo de adesão celular ainda é dependente da presença e ativação das E-caderinas para manter o contato íntimo entre células justapostas (Vinken, 2012).

A figura 17 ilustra de forma simplificada as interações que a proteína Cx43 pode realizar quando ancorada na membrana citoplasmática da célula, incluindo algumas proteínas que fazem parte do mecanismo de crescimento e morte celular, evidenciando assim, seu importante papel na coordenação da homeostasia tecidual.

Figura 16- Ilustração do ciclo de síntese e degradação da Cx43. A Cx43 inserida no retículo endoplasmático é corretamente processada e transportado ao aparato de Golgi para ser submetida à oligomerização das seis subunidades, formando o hexâmero denominado connexon. Por meio do transporte facilitado de microtúbulos a vesícula de transporte é direcionada à membrana onde é ancorada pelos domínios transmembranares formando placas de comunicação entre células adjacentes. Algumas teorias propõe a possibilidade desses connexons não justapostos poderem lançar ao micro-ambiente extracelular pequenas moléculas. Após o término da expectativa de vida, ou seja algumas poucas horas, as conexinas são ubiquitinizadas e internalizadas, formando os conexossomos, e posterior degradação nos lisossomos. Adaptado de Naus, 2010.

Figura 17- Ilustração da interação da Cx43 com complexo proteico na membrana plasmática celular. Além da formação do poro a Cx43 está presente na regulação de outros processos, entre eles o de proliferação e morte celular. As conexinas são frequente co-localizadas com as proteínas de adesão e-caderinas devido a necessidade do contato íntimo proporcionado por elas para a formação dos poros celulares. As conexinas também se unem às β -cateninas agindo na coordenação de proliferação e morte, pois esta possui função de modulador transcricional pela via de sinalização Wnt. A Cx43 também pode unir-se às proteínas ZO-1 e ZO-2 que interagem com os fatores ZONAB que ativam fatores de transcrição da homeostase celular. Adaptado de Vinken, 2012.

2.3.3 Regulação da expressão do gene Cx43

A regulação do gene Cx43 é um intrincado processo que envolve mecanismos pré-transcricionais e pós-transcricionais. Devido ao baixo tempo de meia-vida da proteína na célula, qualquer alteração no processo de regulação de expressão pode acarretar reduções drásticas no processo de comunicação celular.

Como descrito anteriormente a Cx43 possui uma estrutura diferenciada das outras conexinas conhecidas, pois possui 2 éxons, sendo que o primeiro pertence à região 5'UTR e é subdividido em cinco subunidades (figura 13A). Além disso o gene possui três diferentes promotores de expressão (P1-3), sendo que o P1 é o que era anteriormente conhecido, downstream ao éxon 1, o P2 é localizado no éxon 1A e o P3 na região intrônica upstream ao éxon 1C (Pfeifer, 2004).

Esses diferentes promotores estão relacionados diretamente com o tecido em que o gene está sendo expresso, por exemplo: O P1 é constitutivamente ativo em todas as células do músculo cardíaco, porém o P2 é ativo somente na região do átrio e septo do órgão, e o P3 é funcional somente nos ventrículos (Pfeifer, 2004).

O tipo de promotor responsável pela transcrição do gene Cx43 aparentemente também está relacionado com diferentes splicings alternativos realizados. Índícios mostram que transcritos mediados pelo P2 possuem o éxon 1B, porém excisam quase sempre o éxon 1D, essa característica é própria da célula que a está expressando e os mecanismos de ativação ainda não são totalmente compreendidos (Oyamada, 2005).

A regulação pós-transcricional do gene Cx43 vem sendo elucidada ao longo do tempo, muitos mecanismos estão sendo descritos, desde o processamento e estabilidade do mRNA, até o controle traducional da proteína. Alguns dos controles estão diretamente relacionados à correta homeostasia celular e desenvolvimento de algumas doenças, entre elas o câncer.

Uma das principais regulações pós-transcricionais está relacionada com a estabilidade do mRNA do gene Cx43. Em camundongos, na região 3'UTR, o mRNA contém uma região rica em Adeninas e Uracilas (AUR). Nessa região ocorre uma variação de AUUUA ou UUAUUUAWW (onde W pode ser U ou A) que confere

seleção de estabilidade do mRNA (Zubiaga, 1995). Essas regiões AUR do mRNA estão envolvidas no processo de ligação de proteínas conhecidas como RNA-BP (*RNA binding proteins*) que por sua vez estão relacionadas com RNAases que degradam o mRNA. Dessa forma, fica evidente um mecanismo facilitador dentro da própria molécula de mRNA para sua auto-degradação (Klotz, 2012).

Dois mecanismos descritos nesse processo de estabilização do mRNA do gene Cx43 estão relacionados com RNA-BP conhecidas como Dead1 (Deade end1) e HuR (Hu antigen R). A primeira proteína está relacionada com o processo de desestabilização da molécula de mRNA aumentando assim as chances dela ser degradado pela ação das RNAases, enquanto a segunda proteína é frequentemente correlacionada com o aumento da meia-vida do mRNA no citoplasma. Ambos mecanismos não são compreendidos, mas evidências em patologias ou em processos de restituição tecidual comprovam esses achados (Klotz, 2012).

A figura 18 ilustra de maneira simplificada esse controle regulatório pela HuR realizada no gene Cx43 humano, bem como as regiões AUR e regiões complementares de reconhecimento e adesão da proteína à molécula de mRNA.

Outro mecanismo regulatório pós-transcricional relacionado ao nosso gene em questão é mediado por micro-RNA. Essas moléculas de até 22 nucleotídeos são geradas por um processo de transcrição próprio e estão associadas com o bloqueio da expressão gênica, pois são capazes de se ligarem a o mRNA alvo induzindo a quebra da calda poli-A e degradação da molécula antes da tradução (Krol, 2010).

Figura 18- Representação esquemática do mRNA do gene Cx43 humano, mais precisamente da região 3'UTR. As regiões ricas em adeninas (A) e uracilas (U) conhecidas como regiões AUR estão representadas em preto e verde. O sítio de reconhecimento e pareamento da proteína RNA-BP HuR está identificada em cinza. Em vermelho esta identificada a região de ligação de micro-RNA regulatórios (miR-1 e miR-206)
Fonte: Klotz, 2012

O micro-RNA está presente no citoplasma na forma de um complexo associado às proteínas, denominado RISC (RNA-induced silencing complex) que por meio de homologia do micro-RNA a uma região específica do mRNA se liga por meio de pontes de hidrogênio. A ligação parcial entre as moléculas de RNA impossibilita a tradução da proteína, enquanto a ligação total acarreta na degradação da molécula na degradação da molécula de mRNA por ação de RNases (Krol, 2010).

Atualmente muitos micro-RNA já foram descritos com homologia por diversas conexinas, porém só um pequeno número desses comprovadamente possuem ação de regulação de expressão gênica (RASH, 2005). Por exemplo, o miR-145 está associado com a regulação da Cx43 em células progenitoras do epitélio da córnea (Lee, 2011).

O miR-1 é um micro-RNA expresso no músculo cardíaco e esquelético e o aumento de sua expressão está frequentemente associado às doenças coronarianas e infecções virais do miocárdio (Townley-Tilson, 2010; Yang, 2007). Nessas duas doenças, a presença do miR-1 coincide com a diminuição dos níveis de expressão de Cx43, e em contrapartida, a redução da expressão do miR-1 foi identificada em pacientes com fibrilação atrial com inalteração dos níveis de mRNA da Cx43. Todos

esses dados sugerem uma regulação gênica da Cx43 intermediada pelo miR-1 (Tang, 2009; Xu, 2012).

As regiões 3'UTR dos genes Cx43 humanos e murinos possuem sequência alvo para o miR-1 (figura 18). Apesar destes achados, ainda não foi comprovada que essa regulação possa levar a algum fenótipo em definitivo, pois aparentemente essa redução da transcrição é compensada pelo o aumento da tradução, tornando o número de proteínas Cx43 praticamente estável nesses casos (Gourdon, 2011).

Outro micro-RNA que sabidamente interage com a Cx43 é o miR-206, que é altamente expresso no músculo esquelético, pele, pulmão e osteoblastos (KIM, 2006). Esse micro-RNA compartilha a mesma sequência de ligação ao mRNA que o miR-1. O miR-206 é um inibidor da diferenciação osteoblástica e sua superexpressão causa a redução nos marcadores de diferenciação de osteoblastos cultivados *in vitro*, entre eles a Cx43. Interessantemente, a diferenciação causada pelo paratormônio nos osteoblastos altera os níveis de proteína Cx43, mas não no seu mRNA, isso pode ser atribuído por ações pós-transcricionais mediado pelos micro-RNA (Klotz, 2012).

Um terceiro mecanismo relacionado à regulação da expressão da Cx43 é pela ação de outro gene, conhecido como pseudo-Cx43 (Ψ Cx43). Aparentemente, a Cx43 é a única das conexinas descritas até hoje que apresentam um pseudogene. Há poucas descrições sobre sua função, mas sabe-se que em humanos, apesar de estar localizado em cromossomo distinto do gene da Cx43 (Ψ Cx43 é localizado no cromossomo 5 enquanto a Cx43 no cromossomo 6) possui estrutura e sequência similar (Kandouz, 2004)

Trabalhos relatam que o Ψ Cx43 possui um papel de regulação íntimo com a Cx43. Em estudos de carcinomas mamários humanos, percebeu-se que as células neoplásicas aumentaram a expressão de ambas as conexinas, reduzindo a comunicação entre as células. Aparentemente o mRNA da Ψ Cx43 compete com o mRNA da Cx43 pela maquinaria traducional da célula, dessa forma controlando os níveis de comunicação celular (Bier, 2009).

Um último mecanismo de regulação acontece após a tradução da Cx43, por intermédio da proteína β -catenina em conjunto com a RNA-BP HuR. Como já

comentado, essa proteína está diretamente relacionada com o complexo membranar formado pelas conexinas. Dessa forma alterações no processo transcricional ou traducional da β -catenina influencia diretamente na localização e funcionalidade dos canais de comunicação (Ale-Agha, 2009).

A figura 19 ilustra todos esses mecanismos discutidos e a etapa de atuação da regulação em cada uma das vias.

Figura 19- Ilustração esquemática das vias de regulação do gene Cx43. Existem várias vias de regulação pós-transcricional, algumas agem diretamente no bloqueio da transcrição através da degradação do mRNA, outras agem na função e migração da proteína para a membrana. Os micro-RNA miR-1 e miR-206 possuem sítio de homologia com regiões do mRNA da Cx43, e dessa forma agem na inibição da tradução ou degradação do transcrito. O mRNA do Ψ Cx43 também possui uma regulação do gene em questão, mas a possível via de controle é por meio da competição da maquinaria de tradução. O último caso ocorre após a tradução da Cx43, sendo ela é dependente da proteína β -catenina para a correta adesão na membrana plasmática e formação do poro, de alguma forma pouco compreendida ainda, o RNA-BP HuR age juntamente com a β -catenina inibindo a migração da Cx43 para a membrana e por consequência inibindo sua função na comunicação intercelular.

2.4 Camundongos geneticamente modificados

A ciência avança conforme a capacidade do homem de observar e experimentar fenômenos do ambiente que ele está inserido, e para isso a evolução biotecnológica ajudou na ampliação do desenvolvimento de modelos animais adequados à pesquisa. Entre esses modelos, os camundongos transgênicos revolucionaram a pesquisa científica nas últimas décadas.

Esses modelos hoje em dia são amplamente utilizados, desde pesquisas básicas de genômica e proteômica, até mesmo como modelos similares de doenças humanas para desenvolvimento de fármacos e terapias. Porém, para o desenvolvimento da tecnologia de criação desses animais, outras tecnologias foram fundamentais, principalmente técnicas de manipulação de DNA *in vitro*.

A tecnologia de desenvolvimento de animais transgênicos é baseada em três principais pilares. (1) Manipulação de embriões que originarão a linhagem transgênica. (2) Construção de DNA em laboratório que carregue um complexo gênico responsável pela expressão do(s) gene(s) de interesse. (3) Fazer com que esse DNA ultrapasse a membrana plasmática do embrião e chegue ao núcleo para integração do vetor ao genoma do embrião, de forma estável. Ao final da técnica, se bem sucedida, obteremos animais que após adultos albergarão em seu genoma o DNA exógeno que foi introduzido artificialmente, e serão capazes de transmitir esse DNA para as gerações seguintes (Chaible, 2010).

A partir daqui abordaremos as diversas técnicas de desenvolvimento desses modelos animais, e discutiremos alguns pontos históricos cruciais no surgimento e ampla divulgação desses animais que revolucionaram o modo de fazer pesquisa na última década.

2.4.1 Visão geral

As pesquisas da área de genética são recentes quando comparamos com outras áreas do conhecimento, como a fisiologia e anatomia, porém nos últimos 150 anos, cada vez mais pesquisadores enveredam nessa área em busca de entendimento de mecanismos complexos de hereditariedade, doenças, síndromes e terapias. Esse processo de aprendizado foi caracterizado pela observação, entre eles a de características fenotípicas dos animais, dando início às primeiras pesquisas genéticas com cruzamento animais para seleção de fenótipos. Essa observação mostrou-se tão importante que encorajou os pesquisadores à criar seus próprios modelos, os quais vêm respondendo questões biológicas (Chaible, 2010).

Tratando-se especificamente de camundongos geneticamente modificados, numa rápida busca de animais transgênicos pelos principais repositórios comerciais, encontramos aproximadamente 2.000 modelos transgênicos no *Jackson Laboratory* (USA), 800 animais no EMMA (*European Mouse Mutant Archive*), 250 modelos depositados no NCI (*National Cancer Institute – USA*). Segundo o IMRS (*International Mouse Repository Resource*) existem 4.714 linhagens de camundongos transgênicos para serem adquiridos por pesquisadores do mundo todo.

Mas esses milhares de animais não foram criados em um curto espaço de tempo, pelo contrário. Primeiramente foi necessária a criação de tecnologias para a manipulação de DNA *in vitro*, tais como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (Mullis, 1986), utilização de enzimas de restrição (Lagerkvist, 1978) e de enzimas de ligação (Lehman, 1974). Dessas técnicas surgiu a capacidade do homem de manipular moléculas de DNA, iniciando assim a indústria da Biotecnologia, que hoje em dia gera 320 bilhões de dólares (Chaible, 2010).

O primeiro camundongo transgênico reportado pela comunidade científica foi em 1980, em que Jon Gordon e Frank Rudle conseguiram inserir uma molécula de DNA no genoma de animais, forma estável e transferível pelas gerações. Esse DNA produzido em laboratório era um plasmídeo bacteriano que continha uma sequência do vírus SV40 (Gordon, 1980).

Desde então o número de animais produzidos vem aumentando ano após ano, e também aumenta sua utilização na pesquisa. Numa rápida pesquisa de artigos

científicos publicados no PubMed, observa-se que nos últimos 20 anos aumentou em 15 vezes o número de trabalhos que utilizam como palavras-chave “camundongo transgênico”, só em 2012 foram mais de 14 mil artigos (figura 20A). Dentre esses trabalhos, observa-se também que muitos abordam o tema comparando com doenças humanas (figura 20B).

Figura 20- Gráficos da evolução do número de publicação ao longo dos últimos 20 anos. (A) Artigos indexados no PubMed contendo a palavra-chave “camundongo transgênico”. (B) Artigos indexados no PubMed contendo a palavra-chave “camundongo transgênico E “modelo de doença”. Em ambos os casos é nítida a evolução no número de artigos na área evidenciando a importância desses animais na pesquisa científica.

Ao longo das últimas três décadas, desde a obtenção do primeiro camundongo transgênico, as técnicas para desenvolvimento desses animais também foi aperfeiçoada. Isso foi fundamental para o aumento da eficiência e também a variedade de estratégias de transgênese. Naturalmente a técnica de transgênese é um ato de adição ao genoma animal, porém a inventividade do homem foi capaz de usar esse artifício para adicionar uma região de DNA que substituísse outra, deletando assim determinada região específica e criando os animais *knockouts*.

Esses animais são resultados, principalmente, de duas grandes tecnologias, a de cultivar células tronco embrionárias (ES) *in vitro*, e a descoberta da recombinação homóloga. O significado da importância dessas descobertas é evidenciado pela premiação dos autores Mario Capecchi, Oliver Smithies, e Martin Evans com o Nobel de Medicina em 2007. O primeiro camundongo knockout foi noticiado em 1989, onde o gene HPRT (*hypoxanthine-guanosine phosphoribosyl transferase*) foi inativado do genoma (Capecchi, 1989).

Desde então muitos outros camundongos transgênicos foram desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa, inclusive no Brasil. O primeiro camundongo transgênico desenvolvido em nosso país foi produzido em 1997 pela equipe da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) liderada pela Dra. Eliana Abdelhay, onde trabalharam com o gene *msx1* (Pereira, 1999). O primeiro camundongo knockout brasileiro foi criado em 2001 pela Universidade de São Paulo (USP) liderado pelos pesquisadores Prof. Dr. José Antonio Visintin e Prof. Dra. Lygia da Veiga Pereira, onde o gene *fbn1* foi inativado para estudos de uma doença humana denominada síndrome de Marfan (Lima, 2010).

Apesar do Brasil já ter obtido algumas dezenas de animais transgênicos, ocupamos uma posição inexpressiva perante outros países. Nosso papel nessa área é como usuários de animais transgênicos e não produtores, dependemos assim, do serviço de laboratórios estrangeiros para o desenvolvimento desses modelos e exportação para o nosso território nacional. Esse nosso papel precisa ser revertido e precisamos dominar essa tecnologia para o avanço e independência da pesquisa brasileira.

2.4.2 Vetores de transgênese

Segundo o dicionário Michaelis, vetor “é aquele que serve como veículo ou intermediário, condutor, portador”. Na transgênese essa definição também é adequada, pois o vetor de transgênese é a estrutura de DNA que porta todo complexo de expressão gênico, servindo assim como veículo de transmissão de informações a serem expressas pelo genoma animal.

Como discutiremos em detalhes nos itens adiante, o vetor de transgênese é uma estrutura complexa construída em laboratório por meio de técnicas de biologia molecular. Essas técnicas, por meio de “cortes” e “colagens”, resultam numa estrutura de DNA contendo diversas regiões, com objetivos diferentes, mas agindo em conjunto.

O primeiro passo para a construção de um vetor de transgênese inicia-se pela idéia, e utilizando-se recursos de bioinformática, traça-se um objetivo de experimentos, onde são definidos: (1) Os genes que serão utilizados e seus

respectivos promotores de expressão; (2) Estuda-se os genes de interesse, dando importância para fatores fundamentais como estrutura do gene, mecanismos regulatórios, ação da proteína, sequência e sítios de restrição dentro dessa sequência; (3) Definição da estratégia de corte e ligação, desenhos de primers e sequência de clonagens; (4) Escolha do vetor de transgênese de acordo como tamanho e complexidade do sistema de expressão.

O vetor de transgênese usualmente é ilustrado por meio de um mapa, onde as estruturas são identificadas e orientadas. Cada estrutura possui função específica e diretamente relacionada com a estratégia traçada. As principais regiões que devem constar num mapa, e que serão discutidas adiante, são: Promotor, gene de interesse, sequência IRES (*Internal ribosome entry site*), gene repórter, sequência de poli-adenilação, origem de replicação, gene de resistência, sítios de restrição e tamanho do vetor. A figura 21 ilustra o mapa de um vetor hipotético.

Figura 21- Ilustração do mapa de um vetor hipotético ilustrando as principais regiões.

2.4.2.1 Promotores de expressão

O promotor de expressão gênica é uma região do DNA que regula a expressão de um gene em particular, geralmente localizado na proximidade do gene a ser transcrito, na mesma fita de DNA, upstream ao start códon e de tamanho variável, 100bp a 10.000bp (Gama-Sousa, 2010)

As proteínas que fazem parte do processo de transcrição, chamadas de Fatores Transcricionais, ligam-se a pequenas sequências de DNA (5-20bp) que por sua vez possuem afinidade a regiões presentes no promotor, entre elas o TATA box. Essa afinidade faz com que todo o complexo tenha adesão ao DNA a ser transcrito e assim iniciando a transcrição do gene em questão. Detalhes podem ser observados na Figura 22 (Small, 1991).

Figura 22- Ilustração esquemática do sistema transcripcional. A região conhecida como promotor possui sequências regulatórias que servem como substrato de adesão para todo o complexo transcripcional, entre elas a proteína RNA polimerase II, que é a responsável pela polimerização da fita de mRNA.

Apesar dos promotores serem relacionados à expressão gênica, nem todo promotor é igual, possuindo seletividade e força diferentes. Quanto à seletividade existem basicamente três tipos: (1) os constitutivos que são expressos em praticamente qualquer tipo celular e em qualquer situação fisiológica da célula, são exemplo deles o pCMV (Citomegalovirus) e pUBc (Ubiquitina C humano); (2) os promotores célula-específicos que são expressos em um único tipo celular, ou alguns tipos específicos, eles são a grande maioria nos sistemas eucarióticos e são os responsáveis pelas diferenças fisiológicas e fenotípicas celulares, são exemplo deles o pAp2 (somente em adipócitos), pAlb (somente em hepatócitos) e pK5 (em todas as células epiteliais); (3) e por último os promotores induzíveis que são regiões que são subordinadas à outra proteína ativadora, essa ativação ocorre mediante a estímulo externo ou fisiológico, são exemplos pTRE (promotor induzido por tetraciclina), pERt (promotor do receptor de andrógeno ativado pelo agonista tamoxifeno) pLacZ (promotor ativado pela presença de lactose) (Conn, 2013; Gama-Sousa, 2010).

Quanto à força os promotores são classificados entre fortes e fracos, variando assim conforme o número de transcritos relacionados com a sua regulação. A força de expressão não é só relacionada com o promotor, mas também com interação célula x promotor e mecanismos epigenéticos de controle (Gama-Sousa, 2010). São considerados promotores fortes o pCMV (promotor viral), o pLacZ (promotor bacteriano) e o p α MHC (promotor humano específico para miocárdio); como promotores fracos são exemplos pUBc (promotor constitutivo humano) e pGK1 (Fosfoglicerato kinase humana) (Qin, 2010).

Os promotores escolhidos na regulação gênica do vetor de expressão devem levar em consideração todos esses pontos discutidos, tais como força e especificidade celular. Cada gene expresso usualmente deve ser associado a um promotor.

2.4.2.2 *Gene de interesse*

Geralmente a sequência do gene de interesse utilizada no vetor de transgênese é correspondente à sequência codificante do gene, representada somente pelos éxons. Essa região é proveniente do cDNA, que é a região complementar originada pela reação de transcrição reversa do mRNA do gene de interesse. Essa região é composta pelos elementos regulatórios 5'UTR e 3'UTR, start códon (ATG), região codificante e stop códon (TAA) (Belizário, 2012).

A vantagem de utilizar o cDNA é que o mRNA transcrito está pronto para ser traduzido, não dependendo assim de mecanismos regulatórios e de sinalização de splicing, e assim evitando que a proteína traduzida seja a de interesse. Outra vantagem é a diminuição do tamanho desse gene a ser inserido no vetor, pois muitas vezes as regiões intrônicas são grandes, e assim, dificultaria as técnicas de clonagem e integração ao genoma (Chaible, 2010).

Apesar da ampla maioria das construções de transgene utilizar somente a região codificante, alguns trabalhos mostram que a inserção estratégica de um intron faz com que a expressão do gene de interesse seja até 300 vezes maior, quando comparado com o gene sem íntron (Choi, 1991; Clark, 1993; Duncker, 1997). Esse intron utilizado pode ser o naturalmente encontrado no gene de interesse, ou utilizar as sequências regulatórias bem conhecidas e que serão excisadas pelo splicing.

2.4.2.3 *Genes repórter*

Genes *reporters* são uma grande ferramenta utilizada em conjunto com os modelos transgênicos, esses genes são heterólogos ao camundongo e proveniente de diversas espécies de seres-vivos, como celenterados, bactérias e insetos (Brader, 2013). A essência desse gene é produzir algum sinal da presença da proteína relacionada, geralmente sinal luminoso, sendo alguns fluorescentes, outros visíveis em luz branca, mas sempre traz ao pesquisador a informação sobre a sua expressão e localização da proteína (Soroldoni, 2011).

Esses genes *reporters* permitiram o desenvolvimento de métodos não invasivos de estudos *in vivo*, por meio de um monitoramento acurado e evolução

temporal dos processos biológicos (Sandhu, 2010). Uma grande variedade de animais transgênicos foi obtida para uso na rotina de estudo de novas drogas, função e localização proteica e estudo de doenças (Belizario, 2012). Os genes reporters mais comuns empregados em camundongos transgênicos são os LacZ (Gene da β -galactosidase), GFP (Green Fluorescent Protein, derivado da água-viva *Aequorea victoria*) e Luciferase (derivada da enzima encontrada em vagalumes *Photinus pyralis*) (Blasberg, 2002; Gould, 1988; Prasher, 1995).

O gene GFP é um dos mais utilizados na transgênese animal devido sua sequência ser bem conhecida, bem como a forma e resposta da proteína. A proteína possui um grande pico de excitação a 395nm e um menor à 475nm, e sua emissão de luz é a 509nm. A fluorescência dessa proteína é atribuída à ligação covalente das regiões α -hélice com o cromógeno 4-(p-hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-one, que quando excitado pela frequência de luz correta reagem com os aminoácidos Ser65–Tyr66–Gly67 emitindo luz (Pouwels, 2008). A importância do GFP foi reconhecida em 2008, onde os seus principais idealizadores, Martin Chalfie, Osamu Shimomura e Roger Tsien foram premiados com o Nobel de Química.

Outro gene repórter muito comum é o LacZ, que é de origem bacteriana, como a *Escherichia coli*, e é responsável pela transcrição e tradução da enzima β -galactosidase. Essa enzima cataliza um substrato incolor chamado X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), que após reação produz um precipitado de cor azul, insolúvel e não tóxico para a célula (Spergel, 2001; Zakany, 1988).

O mesmo princípio do LacZ é utilizado em outro gene repórter, a luciferase. Esse gene é responsável pela enzima de mesmo nome que participa do metabolismo oxidativo de algumas células de insetos. Essa proteína quando oxidada e na presença de ATP torna-se bioluminescente, emitindo luz numa faixa de 550nm a 620nm (Fraga, 2006).

Hoje em dia possuímos muitos genes reporters disponíveis, a grande maioria é fluorescente, e com diversas faixas de excitação e emissão, assim podendo ser utilizados em conjunto. Uma das alternativas comerciais ao GFP é o gene ZsGreen (Clontech Industries – USA) que é proveniente do coral marinho *Zoanthus sp*, e possui maior fluorescência *in vivo* que o eGFP comercial (Wouters, 2005). A figura

23 ilustra alguns dos genes reporters disponíveis e utilizados em animais geneticamente modificados.

Figura 23- (A) Ilustração de alguns dos genes reporters disponíveis comercialmente com suas respectivas faixas de excitação e emissão. (B) Camundongos transgênicos com o gene repórter LacZ, a presença do gene é identificada pela coloração azul após a reação com o substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). (C) Camundongo da linhagem Nude portando o gene GFP expresso de forma ubíqua, e apresentando o fenótipo verde quando exposto à luz ultravioleta.

2.4.2.4 Gene Tagging

Gene Tagging refere-se a sequências de nucleotídeos adicionadas à sequência codificante de interesse, que deve ser expressa e estar presente na proteína, de maneira que não altere sua função biológica (Gama-Sousa, 2010). Essa região adicionada é denominada assim devido ao idioma inglês, referindo-se à “marcação do gene”.

Essa técnica permite de maneira acurada determinar quando o gene é expresso e visualizar em tempo real sua expressão, localização ou ativação em células vivas. Quando trabalhamos com genes que naturalmente são expressos no sistema biológico, seja *in vivo*, ou *in vitro*, essa técnica é de grande valia para diferenciarmos o gene endógeno do gene recombinante, pois ambos possuem a mesma sequência gênica e proteica. Dessa forma, o gene recombinante é marcado com um *tag* de diferenciação (Malhotra, 2009).

Essas marcações podem ser genes reporters ou epítomos que são traduzidos e fusionados à proteína de interesse, essa inserção pode ser na região N-Terminal ou Carboxi-Terminal (Malhotra, 2009). A marcação com epítopo facilita a identificação da proteína recombinante por meio de anticorpos específicos e devido seu pequeno tamanho diminui as chances de interferência na função da proteína de interesse. O quadro 3 ilustra os principais *tag* utilizados em proteínas recombinantes.

Um dos epítomos mais utilizados atualmente é o V5, que é constituído de uma sequência de 14 aminoácidos (GKPIPNPLLGLDST) ou sua versão reduzida de 9 aminoácidos (IPNPLLGLD). Essas sequências são provenientes do vírus de símios Paramyxovirus, ou SV5, e formam uma região na proteína que é capaz de se ligar ao anticorpo anti-V5 (Lobbestael, 2010; Southern, 1991).

Desplantez, et al. (2011) demonstraram que o gene Cx43 quando expresso com o epítopo V5 na porção C-Terminal não alterava a conformação da proteína, nem mesmo a sua migração para a membrana e permeabilidade celular. Eles também demonstraram que quando esse mesmo tag era associado a uma cauda de histidina, o poro formado pela Cx43 tornava-se afunacional. O mesmo problema na

funcionalidade da comunicação celular foi observado por Hunter, et al. (2003) em que fusionaram a proteína Cx43 com a proteína repórter GFP na porção C-Terminal.

Quadro 3- Relação dos principais tags utilizados na identificação de proteínas recombinantes

Nome	Tipo	Sequência	Descrição
Green Fluorescent Protein (GFP)	Proteína	NC_011521.1	Proteína fluorescente verde que pode ser identificada por meio da fluorescência ou por anticorpo específico.
Luciferase	Proteína	M15077.1	Enzima bioluminescente utilizada como gene repórter, mas também pode ser detectada por anticorpo específico.
Hemaglutinina A	Epítipo	YPYDVPDYA	Derivado do vírus influenza possui resíduos que liga-se fortemente ao anticorpo
Herpes Simplex Virus (HSV)	Epítipo	QPELAPEDPED	Derivado da glicoproteína do envelope do vírus da herpes, estável e de baixa interferência na função biológica da proteína
c-Myc	Epítipo	EQKLISEEDL	Muito utilizado por possuir anticorpos validados tanto para western blotting, imunofluorescência e citometria
Proteína A	Antígeno	AAA26681.1	São antígenos bacterianos que são reconhecidos por qualquer IgG, utilizados para detecção secundária de anticorpos.
T7	Epítipo	MASMTGGQQMG	Esse epítipo é derivado do fago-T7 e é pouco utilizado em proteínas para reconhecimento <i>in vivo</i> .
V5	Epítipo	GKPIPPLLGLDST	Epítipo derivado do Paramyxovirus SV5, possui muitos anticorpos e vetores comerciais disponíveis.
VSV-G	Epítipo	YTDIEMNRLGK	Epítipo muito utilizado derivado da glicoproteína VSV-G, muito utilizados e com produtos comerciais disponíveis.

2.4.2.5 *Internal ribosome entry site – IRES*

A sequência IRES foi descoberta em 1988 depois de estudos com o RNA vírus da poliomielite. Nesses estudos percebeu-se que algumas regiões do RNA eram capazes de atrair ribossomos eucarióticos e iniciar o processo de tradução. Essa região é frequentemente utilizada pelos vírus para se assegurar que a tradução das proteínas virais estão ativas, enquanto algumas proteínas da células hospedeira são inibidas (Pelletier, 1988).

Essa habilidade do ribossomo reconhecer a sequência IRES presente no mRNA e iniciar a tradução pode ser utilizada para a expressão de duas ou mais proteínas presentes em uma única molécula de mRNA. Esse sistema de coexpressão de duas proteínas recebe o nome de policistrônico e pode ser utilizado tanto em sistema de expressão bacteriano, como eucariótico (Martínez-Salas, 1999).

O sistema de coexpressão de duas proteínas esta sendo muito utilizado para associação de genes de interesse com genes de seleção, com antígenos de superfície, com genes reporters, ou até mesmo dois genes de interesse que estão associados na mesma via metabólica (Mountford, 1995).

A região IRES é uma sequência que varia entre 130 e 460 nucleotídeos e é subdividida entre quatro domínios, e um start códon interno. Em vetores de expressão, o IRES é localizado entre dois sítios de clonagem para a inserção dos dois genes, e ambos genes são controlados por um único promotor (Figura 24A). É muito importante que o gene localizado downstream ao IRES esteja em consenso ao ATG do IRES (*in frame*), para a correta expressão e tradução, como ilustrado na figura 24B (Martínez-Salas, 1999).

2.4.2.6 Sinal de Poli-Adenilação

As caudas Poli-A são estruturas presentes na extremidade 3'UTR de praticamente todas as moléculas de mRNA, com exceção das histonas, são regiões ricas no nucleotídeo adenina que promove estabilidade, pois protege a molécula da degradação de enzimas citoplasmáticas (Wahle, 1992).

O processo de inserção da cauda poli-A ocorre dentro no núcleo celular, iniciando por uma clivagem no mRNA primário, seguido da poliadenilação do fragmento de mRNA. A clivagem ocorre na região AAUAAA localizada aproximadamente à -20bp da região inicial da polimerização da cauda poli-A, e é realizada por um complexo denominado CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) (BALB, 2007).

Após a clivagem do mRNA, o processo de poliadenilação inicia-se catalisado pela enzima Poliadenila Polimerase que constrói a cauda poli-A adicionando unidade adenosina monofosfato ao mRNA. Outra proteína chamada PAB2 liga-se à nova região poli-A aumentando a afinidade e estabilidade da enzima polimerase, mas quando a cauda alcança por volta de 250 nucleotídeos de extensão, a enzima perde afinidade e encerra o processo (Balbo, 2007).

A grande maioria dos vetores comerciais disponíveis já possuem em sua construção regiões reguladoras do processo de poliadenilação, e essas regiões são provenientes de vírus como o SV40 e CMV ou do hormônio de crescimento bovino bHG.

2.4.3 Tipos de vetores de expressão

Como discutido nos itens anteriores os vetores de expressão possuem elementos imprescindíveis para o correto funcionamento e adequação à estratégia de expressão desejada pelo pesquisador. Sabendo disso, aparentemente podemos considerar que todos os vetores são iguais, porém isso não é verdade. Algumas estratégias de transgênese exigem vetores que se adequem à necessidade,

principalmente se tratando do tamanho do gene de interesse, do número de genes expressos, ou complexidade do sistema.

Os vetores mais comuns utilizados nas técnicas de transgênese animal são os plasmídeos bacterianos, seguidos depois pelos vetores virais. Apesar das grandes diferenças metodológicas de cada um deles, ambos possuem mais vantagens que desvantagens em relação aos vetores de cromossomos artificiais. As grandes vantagens desses sistemas são relacionadas com a facilidade de realizar as construções em um curto espaço de tempo, de forma barata, e que ao final possuirá uma alta taxa de integração ao genoma do animal (Chaible, 2010).

Os plasmídeos são pequenas sequências de DNA circular, auto-replicantes, encontrados naturalmente em bactérias que possuem de 1kb até 1Mb. Na natureza estão relacionados com genes de adaptação e resistência ao ambiente, porém na biotecnologia eles são uma grande ferramenta para clonagem e expressão de genes heterólogos, seja *in vitro* ou *in vivo* (Chaible, 2010).

Na transgênese os plasmídeos são utilizados de maneira mais restrita quanto ao tamanho, é preferível utilizar vetores de até 12Kb, sendo que após esse tamanho a taxa de integração ao genoma reduz para menos de 1% (Hofker, 2003).

Já os vetores virais são ainda menores, podendo ter até 8kb, mas apesar da impossibilidade de albergar grandes fragmentos esses vetores apresentam uma grande vantagem em relação aos outros, eles são auto-infectantes. O *backbone* do vetor possui genes que são relacionados à formação do capsídeo viral e mecanismos de infecção, dessa forma quando são expressos esses genes acessórios “empacotam” o gene de interesse e o transferem diretamente para as células infectadas (Goff, 1976).

Além da facilidade de entrega desse transgene, podemos escolher vírus diferentes, para objetivos diferentes. De acordo com o vírus escolhido, podemos selecionar se o transgene será integrado ao genoma de forma estável, ou se simplesmente ficará epissomal e com expressão transitória. Geralmente nas técnicas de transgênese animal, escolhemos os vetores retrovirais ou lentivirais, pois são capazes de integrar o gene de interesse ao genoma de forma estável e

duradoura, diferentemente dos vetores adenovirais que são associados à expressão transitória (Belizario, 2012; Montini, 2006; Cattoglio, 2007)

Em casos que o transgene torna-se grande de mais, ou seja, entre 100 - 150kb, é necessário optar por métodos de construções alternativas, pois vetores convencionais como os plasmídeos são incapazes de albergar esse tamanho de insertos. Nesses casos temos a opção de cromossomos artificiais que são capazes de alcançar tamanhos bem maiores que os plasmídeos bacterianos, tais como os cromossomos artificiais P1 (PACs), cromossomos artificiais bacterianos (BACs), os cromossomos artificiais de leveduras (YACs), ou até mesmo cromossomos artificiais humanos (HACs) (Hofker, 2003).

A escolha do vetor de transgênese está diretamente relacionada com o número e tamanho de cada inserto, os vetores virais albergam insertos de até 8kb, os plasmídeos suportam construções de até 100kb, os PACs podem conter insertos de até 100kb, os BACs insertos de até 300kb, os YACs até 2Mb e os HACs até 10Mb. É necessário frisar que quanto maior o inserto, maiores são as dificuldades de construção e clonagem da estrutura, como também menor a taxa de sucesso de integração do vetor ao genoma do animal (Hofker, 2003).

A figura 25 resume os principais tipos de vetores utilizados nas técnicas de transgênese, discriminando os tamanhos adequados de cada um deles, bem como suas principais características.

Figura 25- Resumo dos principais vetores utilizados nas técnicas de transgênese animal, com suas principais características e tamanho de cada um. BACs (Bacterial Artificial Chromosome); YACs (Yeast artificial chromosome); HACs (Human artificial chromosome).

2.4.4 A tecnologia de produção de camundongos geneticamente modificados

2.4.4.1 Bases da reprodução murina

Os camundongos (*Mus musculus*) são pequenos mamíferos da ordem dos rodentia que são encontrados naturalmente em todo o mundo, porém os animais que conhecemos hoje são resultados de cruzamentos das subespécies *Mus musculus musculus* (Leste Europeu), *Mus musculus domesticus* (Oeste Europeu), *Mus musculus castaneus* (Sudeste Asiático) e o *Mus musculus molossinus* (Japão). Nos acasalamentos endogâmicos para a geração de animais isogênicos, a maior frequência gênica é derivada dos animais *Mus musculus domesticus* (Jackson Laboratory, 2013).

As características reprodutivas desses animais são variáveis conforme a linhagem que tratamos, porém em média eles alcançam a maturidade sexual entre 5 e 8 semanas de vida, possuem ciclo estral espontâneo de quatro dias, sendo que ovulam entre 6 e 16 óvulos a cada ciclo. A gestação tem duração de 18.5 a 21 dias, com ninhadas de 2 a 16 filhotes, e possuem uma vida de reprodução de até oito meses (Jackson Laboratory, 2013).

As fêmeas só permitem a cópula dos machos na fase de estro e a identificação dessa fase é muito importante na seleção das fêmeas receptoras dos zigotos produzidos pela técnica de transgênese. Essa fase é evidenciada pela vagina intumescida, de coloração mais intensa e canal vaginal dilatado. No levado vaginal é possível identificar a presença de somente células epiteliais (Figura 26A) (Champlin, 1973).

Em animais de ciclo claro/escuro de 12h/12h, os casais são formados no período noturno, e a cópula e a ovulação (E0) ocorre por volta de quatro horas depois. Trabalhos mostram que a fertilização do oócito ocorrerá no início da manhã seguinte (E0.5), por volta de oito horas após a cópula (CHAMPLIN, 1973; GRASSO, 1988). A confirmação da cópula é feita logo no início da manhã por meio da visualização do plug vaginal derivado do sêmen depositado no canal vaginal (Figura 26B).

A singamia dos pronúcleos (E1.0) ocorrerá após 14h da fertilização, já a primeira clivagem do embrião (E1.5), bem como a ativação do genoma ocorrerá num prazo de até 24h após a fertilização. Desse momento em diante o embrião iniciará consecutivas clivagens e percorrerá toda a extensão do oviduto, até que depois de 72 horas chegará ao útero na fase de blastocisto eclodido (E4) onde irá implantar-se no endométrio uterino e continuar o desenvolvimento (Figura 26C-D).

Figura 26- (A) Ilustração das etapas do ciclo estral murino e alterações morfológicas da fêmea e do lavado vaginal. (B) Identificação da ocorrência de cópula. (C) Estágios de desenvolvimento embrionário e morfologia do embrião. (D) Estágios do desenvolvimento embrionário em relação ao dia de fecundação e localização do sistema reprodutor da fêmea. Adaptado de NIH e JAX website.

Para a técnica de transgênese obtemos os embriões diretamente do oviduto da fêmea copulada, mais especificamente da região da ampola, e essa colheita ocorre por volta de 8 horas após a cópula. Com o intuito de aumentar o rendimento de embriões por fêmea, é comum utilizarmos protocolos hormonais de superovulação. Esses protocolos consistem em doses de hormônios FSH e LH para estimular a foliculogênese mais intensa em consequente maior número de oócitos.

No momento da colheita do embrião, ele ainda está no estágio de zigoto, sem a singamia dos pronúcleos, o que é fundamental para a realização da técnica de microinjeção pronuclear. Após a micromanipulação é possível optar por duas formas de transferir esses embriões de volta à fêmeas receptoras para continuar o seu desenvolvimento, transferir para o infundíbulo, ou diretamente para o útero.

No primeiro caso a transferência é realizada logo após a micromanipulação, por meio de uma rápida cirurgia. Nessa técnica é importante que os zigotos estejam cultivados em meio de cultura para manter o ambiente adequado até retornar ao sistema reprodutor da fêmea. No caso de transferência uterina, após a micromanipulação os zigotos são cultivados em meio de cultura M16 por 90 horas e transferido para os cornos uterinos. Apesar de a segunda técnica ser uma cirurgia mais simples que no primeiro caso, a taxa de nascimentos é menor devido o cultivo *in vitro* não ser o ideal (Cartwright, 2009; Gama-Sousa, 2010).

Independente do tipo de transferência de embrião adotada, o número de embriões transferidos é de grande importância. Primeiramente a fêmea receptora deve estar sincronizada com a idade dos embriões, ou seja, ter sido copulada por macho vasectomizado no mesmo dia que eles foram originados. Em segundo lugar, é necessário um número de embriões em desenvolvimento suficientes para manter o corpo lúteo e o estímulo hormonal de progesterona, pois esse hormônio é de fundamental importância para a aceitação do embrião pelo organismo materno e também a nutrição dele (Cartwright, 2009; Conn, 2013).

2.4.4.2 *Técnicas de entrega do vetor*

A entrega do vetor de transgênese para dentro do embrião é uma etapa fundamental para a obtenção dos modelos geneticamente modificados. Durante a evolução da tecnologia, várias técnicas foram desenvolvidas, algumas entraram em desuso devido a baixa eficiência, outras persistem até hoje. A técnica de entrega é basicamente dividida em dois tipos: (1) Entrega do vetor diretamente nos zigotos; (2) Entrega do vetor em células tronco embrionárias e posterior transferência dessas para o embrião.

O método de entrega do vetor diretamente ao embrião é o mais comum e mais utilizada no dia-a-dia da obtenção de animais geneticamente modificados e baseia-se na ideia de por meio de uma micro-agulha injetar a solução contendo o vetor dentro do embrião. Ela foi desenvolvida no início do século 20 no Instituto Rockefeller por M.A. Barber, mas foi a partir da década de 70 que ela começou a ser mais empregada em pesquisa, e a primeira vez que foi utilizada no intuito de obter um animal geneticamente modificado foi em 1980 por John Gordon e seus colaboradores (Gordon, 1980; Lacal, 1999).

Os embriões que são utilizados nessa técnica são zigotos recém fertilizados, em que ainda não houve a singamia dos pronúcleos (E1), com exceção da técnica de ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), em que usamos o oócito não fertilizado (E0). A região de injeção do vetor também é variável e dependente do tipo de vetor de transgênese utilizado.

O tipo de microinjeção mais comum é a microinjeção pronuclear, em que os vetores de transgênese são injetados dentro de um dos dois pronúcleos (masculino ou feminino). Essa técnica foi a utilizada por Gordon et al. (1980) na obtenção do primeiro camundongo transgênico, sendo utilizada até hoje com o mesmo propósito. É uma técnica relativamente simples, mas é necessário equipamentos específicos de micromanipulação associados a um microscópio invertido, destreza e paciência por parte do operador (Wall, 2001).

A microinjeção pronuclear é utilizada, principalmente, para a transferência de vetores de origem plasmideal, não sendo adequada para uso de vetores virais, nem

recomendada para cromossomos artificiais (Wall, 2001). A solução a ser injetada contém o vetor de DNA linearizado em concentrações por volta de 1 a 2ng/uL e por meio de uma micro-agulha (1um de diâmetro) penetra-se pelas diversas membranas do zigoto até alcançar o pronúcleo, onde injeta-se aproximadamente 2pL (pico-litro), o que corresponde a 1-2% do volume total do zigoto (Wall, 2000; Wall 2001). Detalhes podem ser observados na figura 27A-B.

Outro método de microinjeção, muito similar ao pronuclear, é a microinjeção no espaço perivitelínico. Essa técnica é utilizada exclusivamente para entrega de vetores virais. Essa técnica baseia-se na autossuficiência dos vírus em infectar células, inclusive os retrovírus e lentivírus utilizados na transgênese animal.

A construção viral, como já discutida anteriormente, possui em seu *backbone* genes associados com o envelope viral e também ao mecanismo de infecção. Esse vetor é transfectado para células eucarióticas cultivadas *in vitro*, onde esse DNA irá ser transcrito e traduzido em proteínas virais contendo o transgene em seu interior. Os vírus contendo o transgene estarão presentes no sobrenadante do cultivo abundantemente, e essa solução será utilizada nas microinjeções (Park, 2007).

Assim como na microinjeção pronuclear, utilizamos uma micro agulha de 1um de diâmetro para injetar os vírus no espaço perivitelínico do zigoto. As técnicas são muito semelhantes, com exceção do volume injetado, que é de aproximadamente 10pL (Park, 2007). As figuras 27C-D ilustram detalhes da técnica.

O último tipo de microinjeção que abordaremos é a técnica de Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Essa técnica iniciou-se em 1971 em um trabalho feito por Brackett et al. (1971) em que desenvolveram uma técnica capaz de fazer espermatozoides frescos incorporarem DNA exógeno. Nesse primeiro momento não foi obtido nenhum camundongo geneticamente modificado, mas Jaenisch et al. (1974) conseguiram sucesso utilizando esse princípio para obter camundongos portadores da sequência exógena do vírus SV40.

Hoje é dia a técnica de ICSI possui diversas utilidades, inclusive na medicina humana ajudando casais com problemas de fertilidade a terem filhos (Catt, 1995; Manipalviratn, 2008). Na transgênese a ICSI é associada à uma incubação dos espermatozoides à uma solução rica em DNA exógeno e polivinil-pirrolidona

(PVP360 10%), assim, grande parte dos espermatozoides, até 55%, incorporam o DNA exógeno. De todas as técnicas discutidas até agora é a mais indicada para entrega de vetores grandes, tais como BACs, pois apresentam as maiores taxas de sucesso (Moreira, 2007).

Os espermatozoides após incubação têm as caudas removidas mecanicamente, ou por choque térmico, e um a um são aspirados pela agulha para serem injetados dentro dos oócitos (fase E0). Utiliza-se uma agulha mais grossa que nas técnicas anteriores, com um diâmetro de 5µm e cada espermatozoide será injetado dentro de um oócito, conforme ilustra a figura 27E-F.

Comparando as três diferentes técnicas aqui discutidas, a que apresenta maior eficiência, ou seja, maior rendimento de animais transgênicos em relação ao número de injeções realizadas é a que utiliza vetores virais. Essa técnica apresenta uma eficiência superior a 20%, porém sua grande desvantagem é que os vírus integram um grande número de cópias de DNA exógeno ao genoma, causando problemas na expressão exagerada do transgene ou disrupção gênica (Gama-Sousa, 2010; Park, 2007).

As técnicas de microinjeção pronuclear e ICSI geral taxas de sucesso de transgênese semelhantes, por volta de 2 e 3%, porém os esses dados são referentes a vetores plasmideais na pronuclear e para BACs na ICSI. Quando analisamos a microinjeção pronuclear de BACs, a taxa de sucesso chega a 0,5% (Moisyadi, 2008). O quadro 4 ilustra os dados quantitativos de cada uma das técnicas.

Figura 27- Ilustração das diferentes técnicas de entrega do vetor de transgênese diretamente ao zigoto ou oócito. (A) Fotomicrografia de um zigoto recebendo a microinjeção pronuclear. (B) Ilustração esquemática da técnica de microinjeção pronuclear. (C) Fotomicrografia de um zigoto recebendo a microinjeção de vírus no espaço perivitelínico. (D) Ilustração esquemática da técnica de microinjeção no espaço perivitelínico. (E) Fotomicrografia de um oócito recebendo a injeção de um espermatozoide contendo vetor de transgênese, na técnica de ICSI. (F) Ilustração esquemática da técnica de ICSI.

Quadro 4- Comparativo das diferentes técnicas de microinjeção

	Linhagem murina utilizada	Número de injeções	Taxa de nascimento	Transgênicos / injeções
Pronuclear	Várias	4739	13,2%	3,2%
Viral	B6D2F1 híbrido	270	27%	23%
ICSI	B6D2F1 híbrido	97	12,3%	2%

Adaptado de MOISYADI, 2008

Até agora discutimos técnicas de entrega de vetores de transgênese diretamente aos embriões, porém existe outra técnica que essa transformação ocorre indiretamente por células tronco embrionárias (ES) e posterior transferência dessas para um embrião murino. Essa técnica não é tão trivial quanto as outras descritas e é utilizada praticamente em um único caso na transgênese: na transgênese *target* para obtenção de camundongos knockouts.

Para esse tipo de transgênese opta em transformar primeiramente células ES, pois a taxa de recombinação homóloga nesse caso é de apenas 1 em 40 mil casos, baixíssima se comparado com as técnicas anteriores de adição que é de 1 integração a cada 20 tentativas (Cheng, 2012; Te Riele, 1992). Adiante discutiremos em mais detalhes as técnicas de adição e de recombinação homóloga.

A transformação das células inicia-se pelo cultivo das células que receberão o transgene, as células ES. Essa linhagem celular é proveniente de blastocistos de camundongos geralmente C57BL6 e cultivadas *in vitro* de maneira que mantenham o seu potencial pluripotente. O vetor, geralmente plasmídeo, é purificado e transfectado para as células por eletroporação ou utilizando o método de lipofectamina. É feita a seleção dos clones positivos para recombinação homóloga e expansão. Detalhes da técnica podem ser encontrados em Tremml, et al.(2008).

Os clones selecionados são microinjetados utilizando agulha de 15µm de diâmetro em blastocistos expandidos de camundongos, geralmente da linhagem

Balb/c que foram colhidos de fêmeas doadoras. A colheita é realizada 3.5 dpc (*days post coitum*) por meio de lavado uterino e posterior cultivo *in vitro*. Costuma-se injetar por volta de 20 células na blastocela do embrião e transferi-los diretamente ao útero da fêmea receptora sincronizada com o tempo do embrião (Cheng, 2012). A figura 28 ilustra a técnica.

Figura 28- Ilustração da técnica de microinjeção de células ES em blastocisto. (A) Fotomicrografia do blastocisto recebendo a microinjeção de células ES transgênicas. (B) Ilustração esquemática da técnica de microinjeção.

2.4.4.3 Transgênese por adição

Os animais geneticamente modificados oriundos da técnica de transgênese por adição são a grande maioria, técnica essa também conhecida como adição aleatória. Nesses animais o DNA exógeno é microinjetado diretamente em zigotos e integra-se randomicamente ao genoma animal, geralmente em concatâmeros contendo múltiplas cópias do transgene original, resultando em regiões integradas de 70 a 100kb. Essa integração ocorre em um único sítio e não possui correspondente no outro cromossomo, resultando assim em animais hemizigotos (Gama-Sousa, 2010).

O fenômeno de integração não é totalmente compreendido ainda, mas evidências sugerem que o DNA exógeno é integrado ao DNA genômico no momento da singamia dos pronúcleos, e a maquinaria de reparo de DNA insere o transgene em regiões aleatórias do genoma do embrião (Gama-Sousa, 2010).

O número de integrações, bem como a eficiência da técnica de microinjeção pronuclear, é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento utilizado. Dessa forma longos fragmentos, maiores que 15kb possuem poucas cópias integradas ao genoma animal (Gama-Sousa, 2010). Devido a natureza randômica da integração, não é incomum o transgene ser inserido em regiões não ativas do genoma, como no centrômero, telômero, ou regiões intergênicas, o que causará baixa expressão do transgene e ausência de fenótipo (Belizario, 2012).

Além do problema de integração em regiões de baixa codificação, nessa técnica há outro problema relacionado à interrupção de outros genes, ou seja, o transgene de interesse ao ser integrado pode interferir na correta sequência de outro gene, causando incorreta transcrição ou total inativação deste (Chaible, 2010).

Apesar desses problemas descritos, essa técnica é amplamente utilizada para obtenção de animais transgênicos, principalmente camundongos. Para evitar erros na correlação do fenótipo com o transgene, é necessária uma boa seleção de animais fundadores e comparações entre eles para avaliar se realmente os efeitos biológicos observados são realmente devido a expressão do gene exógeno ou devido a regiões de integração.

2.4.4.4 Transgênese por recombinação homóloga

A recombinação homóloga é um tipo de recombinação genética em que sequências de nucleotídeos são permutadas entre duas sequências de DNA similares ou idênticas. Esse fenômeno ocorre naturalmente em diversos organismos, inclusive em células eucarióticas. Nessas células esse mecanismo é o responsável por novas combinações de sequências de DNA durante a meiose de gametas (Alberts, 2002).

Embora a recombinação homóloga varie amplamente entre diferentes organismos e tipos de células, a maioria das formas envolve os mesmos passos básicos. Inicia-se com a quebra da dupla hélice de DNA, secções na região 5' são excisadas em um processo chamado ressecção, a fita quebrada invade a região 3' da sequência homóloga que não está quebrada e formam-se junções que ligam as

duas moléculas de DNA e ocorre a permuta de regiões das duas sequências (Alberts, 2002).

Esse processo ocorre naturalmente nas células progenitoras de gametas durante a meiose, gerando o processo de crossing-over, porém células em altos níveis de proliferação ou em estresse ambiental também utilizam esse processo para correção de quebras de DNA que ocorrem ocasionalmente (Krejci, 2012).

Devido a característica natural desse processo recombinar somente moléculas de DNA com alto nível de similaridade, a engenharia genética utilizou esse mecanismo natural para inserir sequências de DNA de interesse de maneira direcionada no genoma animal, conhecida como integração *target*. Os pesquisadores que desenvolveram esta tecnologia foram premiados em 2007 com o prêmio Nobel de medicina.

Na técnica de transgênese, para que a recombinação homóloga ocorra, é necessário flanquear o gene de interesse por duas longas regiões homólogas, chamadas de braço direito e braço esquerdo, que combinadas possuem de 6 a 10kb de tamanho. O braço mais longo preferencialmente flanqueia o gene de interesse na região upstream a ser recombinada, enquanto o braço mais curto a região downstream (Joyner, 2000).

Na transgênese murina, a metodologia *target* é um mecanismo refinado com muitas empresas, centros de pesquisa que oferecem serviços de apoio ao pesquisar de maneira que facilite e agilize a obtenção dos modelos desejáveis. Hoje em dia as modificações possíveis incluem deleções gênicas, inversões, translocações, mutações, substituições e outras formas de modificação genômica (Gama-Sousa, 2010).

Um dos problemas dessa metodologia é frequência de recombinação, pois apesar de variar conforme a homologia e tamanho da construção que se utiliza, as construções de até 15kb possuem uma frequência de aproximadamente 1/40.000, piorando em vetores maiores, podendo chegar em até 1/10⁹ eventos (Joyner, 2000). Desse modo torna-se inviável fazer essa metodologia diretamente em embriões. Sendo assim adotou-se primeiramente transformar células ES e posterior transferência para blastocisto, como já descrito anteriormente.

Os vetores de transgênese são eletroporados para células ES na esperança de albergarem a sequência de DNA de interesse, porém o DNA exógeno possui mil vezes maior probabilidade de ser integrado ao genoma aleatoriamente que de maneira direcionada por recombinação homóloga (Krejci, 2012). Dessa forma o vetor deve possuir sequências de controle que possibilitem identificar os clones celulares que albergam o DNA por meio da recombinação.

Geralmente são utilizados como gene de seleção positiva (presença do transgene) o gene NEO^r. Esse gene promove a resistência das células eucarióticas ao antibiótico neomicina, dessa forma quando o cultivo *in vitro* é submetido à 180ug/ul do seu análogo G418, somente as células que possuem esse gene sobreviverão (Yagi, 1990). Nesses clones sobreviventes, para diferenciar os que receberam o gene por adição dos que receberam por recombinação homóloga utilizamos o gene suicida Timidina Kinase proveniente do herpes-virus (HSV-TK), que é inserido fora da região de recombinação.

Esse gene quando expresso, e na presença de ganciclovir gera uma reação citotóxica que mata as células. Dessa forma as células que receberam o transgene por adição, possuirão essa sequência presente e morrerão, ao contrário das células que receberam o transgene NEO^r por recombinação, que sobreviverão por não ter o gene HSV-TK (Yagi, 1990). As diferenças estruturais entre recombinação e adição estão ilustradas na figura 29.

Figura 29- Ilustração esquemática da metodologia de recombinação homóloga em células tronco embrionárias (ES). O vetor de transgênesis é construído de forma a possuir regiões homólogas ao gene alvo para a possibilidade de recombinação homóloga e também genes de seleção positiva (NEOr flanqueado pelas regiões homólogas) e seleção negativa (TK inserido externamente das regiões homólogas). Após a transfecção as células possuem três alternativas genótipos, o primeiro deles é a recombinação homóloga, em que possuirá somente as regiões homólogas e o gene NEOr; o genótipo de adição aleatória em que ambos os genes de seleção estão presentes; e a última possibilidade é de não haver a inserção do vetor. É feita a seleção dos clones celulares por meio do antibiótico neomicina e ganciclovir, e dessa forma somente as células que receberam o vetor por meio da recombinação homóloga irão prosperar e se desenvolver.

2.4.5 Tipos de camundongos geneticamente modificados

Quando o assunto é transgênese animal, muitos modelos são encontrados atualmente, mas muito mais que a aplicação de cada um deles, o que os diferencia é a metodologia utilizada para a sua obtenção de cada um deles. A seguir discutiremos algumas das principais formas e modelos encontrados atualmente.

2.4.5.1 Camundongos transgênicos convencionais.

Esse modelo de obtenção de camundongos é o mais simples e desde o primeiro obtido por Morgan, et al. 1980, pouco se alterou. Esses animais são derivados de construções plasmidiais na sua grande maioria, mas também podendo ser derivados de cromossomos artificiais como BACs, YACs e HACs.

Eles albergam uma região de DNA exógenos que foi inserido de maneira artificial e estável ao genoma de todas as células que compõe o organismo, sendo assim capaz de passar essa característica à sua prole (Chaible, 2010). Nessa técnica utilizamos microinjeção pronuclear em zigotos ou ICSI para a entrega do vetor, sendo que esse DNA usualmente possui um ou mais genes ativos com todo o complexo regulador de expressão.

Animais obtidos por essa técnica possuem diversas funções na pesquisa básica e aplicada, podendo ser empregados na pesquisa de função gênica *in vivo*, modelo de doenças genéticas, terapias gênicas, entre muitas outras aplicabilidades.

2.4.5.2 Camundongos knockout

Camundongos knockouts são animais que receberam a inserção de um transgene de maneira direcionada que substituiu a região codificante de outro gene, assim tornando esse segundo gene inativo (Gama-Sousa, 2010). O primeiro relato de um animal knockout foi feito por Mario Capecchi e seus colaboradores em 1989, onde inativaram o gene HPRT de camundongos. Desde então centenas de outros genes foram inativados utilizando o princípio da recombinação homóloga.

Para a obtenção de animais knockouts utiliza-se a inserção direcionada do vetor de transgênese por meio de sequências homólogas presentes tanto no vetor, quanto no DNA genômico do gene alvo. O objetivo é que o vetor substitua uma região importante do gene alvo e dessa forma o gene não seja mais expresso, e por consequência não tenha mais função biológica (Gama-Sousa, 2010).

Como já discutido anteriormente, células ES são alteradas e as positivas para recombinação homóloga são selecionadas e microinjetadas em blastocistos. Essas células transgênicas irão se associar às células normais do embrião originando um animal quimérico, ou seja, que possui células normais e transgênicas ao mesmo tempo. Dos animais quiméricos são escolhidos aqueles que possuem maior quimerismo de células transgênicas, e isso é feito baseando-se na cor da pelagem, já que as células ES transgênicas são derivadas de animais aguti C3H e o blastocisto de animais pretos C57BL6 (Chaible, 2010; Travis, 1992). A figura 30 ilustra em detalhes a técnica.

A técnica de produção de animais knockouts já está muito bem estabelecida para camundongos, porém esbarra em algumas limitações, tais como o fato de alguns trabalhos relatarem interferência do gene de seleção NEO^r no genoma animal (Meier, 2010; Xu, 2001); poucas espécies animais possuem protocolos para cultivo de células ES; mortalidade embrionária em animais com deleção nos dois alelos (Chaible, 2010; Reaume, 1995; Yamazaki, 2012); tempo e custos de obtenção desses animais (Plück, 2009).

Pensando nesses problemas, novas e promissoras técnicas surgiram nos últimos anos, uma delas é chamada de *Zinc Finger Nucleases* (ZFN). Essa técnica baseia-se em induzir um corte no DNA genômico na região do gene alvo por meio de uma enzima nuclease, e dessa forma induzir o reparo pela maquinaria celular e assim aumentar as chances de recombinação homóloga (Le Provost, 2010). Trabalhos vêm mostrando que essa quebra intencional aumenta muito a frequência da recombinação homóloga, deixando de ser de $1/10^9$ para $1/10^2$ até $1/10^4$ (Le Provost, 2010; Smith, 2006).

Figura 30- Metodologia de obtenção de animais knockouts. (A) Ilustração esquemática dos passos a serem seguidos para a obtenção das quimeras que por sua vez serão utilizados para obtenção dos animais fundadores. (B) fotomicrografia da microinjeção de células ES transgênicas em blastocisto. (C) Fotografia das linhagens animais utilizadas no experimento. O animal de pelagem negra C57BL6 é utilizado como doador de embrião, enquanto os animais aguti utilizados como doadores de células ES. A quimera possui um misto das duas pelagens, e consideramos animais com alto grau de quimerismo aqueles que possuam maior porcentagem de pelagem aguti.

Ainda pensando na solução dos problemas dos animais knockouts convencionais, outra técnica surgiu para resolver o problema de letalidade embrionária, os knockouts condicionais. Estima-se que um terço dos genes quando inativados resultam em letalidade embrionária ou fetal, o que impossibilita os estudos em animais adultos (Gama-Sousa, 2010).

Esses animais condicionais, ao contrário dos convencionais, apresentam a inativação do gene em condições específicas, sejam elas espaciais ou temporais. Essa seletividade ocorre por meio de um sistema conhecido como Cre-lox, onde Cre é referente à enzima recombinase, e o lox, à sequência de DNA denominada loxP que é sensível à recombinase Cre. Esse sistema é dependente da recombinação homóloga nas células ES que albergará o vetor de transgênese flanqueado com as sequências loxP (Chaible, 2010).

Os animais que albergarem em seu genoma esse vetor possuirão a expressão normal do gene alvo, pois nada foi alterado a não ser adicionar os sítios loxP ao redor dessa região de interesse. Para a excisão do gene alvo é necessário o acasalamento com animais transgênicos para a recombinase Cre, pois dessa forma o F1 desse acasalamento será um duplo transgênico que será knockout (Chaible, 2010). Apesar dos animais F1 possuírem o transgene em todas as células do organismo, somente as células que expressarem a enzima Cre é que serão knockouts, e essa expressão pode ser modulada por diversos promotores de expressão célula-específicos, ou induzíveis (Gama-Sousa, 2010).

Animais knockouts possuem diversas utilidades na pesquisa básica e aplicada. Podem ser utilizados em estudo da função gênica, como modelo de doenças e síndromes relacionadas à inatividade de genes, predisposição genética à doenças, terapia gênica, entre muitas outras.

2.4.6 *Camundongos geneticamente modificados utilizados como modelo de doenças humanas*

Os animais são estudados desde o início da civilização humana devido a curiosidade do homem em compreender o funcionamento dessa impressionante máquina biológica. Muito dos conhecimentos adquirido no passado sobre a fisiologia humana também derivaram desses estudos, pois por embargos religiosos era proibida a profanação de corpos humanos, mesmo depois de mortos. Esses estudos até hoje são realizados, e o principal forma de utilizar animais hoje em dia é para o entendimento de doenças humanas e desenvolvimento de fármacos e terapias.

O grande motivo de usar esses animais é a grande similaridade entre os tecidos das espécies e também da proximidade fisiológica de muitas doenças. O camundongo especificamente é um dos grandes modelos animal utilizados atualmente, devido seu tamanho, que facilita a logística de experimentos, intervalo de gerações curtas, de aproximadamente três meses, rápido envelhecimento, já que aos 15 meses é considerado idoso, e proximidade genética entre eles e os humanos (Conn, 2013).

Essas espécies são muito próximas geneticamente apesar de terem se distanciado na evolução a 65 – 100 milhões de anos atrás, ambas possuem aproximadamente 30.000 genes, aproximadamente 85% dos genomas são idênticos e 70,1% dos aminoácidos conservados, 60% das proteínas possuem praticamente 99% de similaridade (Emes, 2003; NIH, 2013). São por esses e outros motivos que o modelo murino atualmente é utilizado para o estudo de centenas de doenças genéticas, síndromes e malformações (Conn, 2013).

Centenas de linhagens de camundongos geneticamente modificados foram criadas para o estudo e compreensão de muitas doenças humanas, entre elas o câncer, a síndromes de Marfan, a síndrome de Huntington, a fibrose cística, hemofilia, diferentes tipos de diabetes, hipertensão, e infertilidade, doenças inflamatórias e neurodegenerativas, modelos de ansiedade, entre outras (Chaible, 2013). Alguns modelos estão ilustrados no quadro 5.

Como discutido até agora, existem muitas vantagens no uso de animais geneticamente modificados para o estudo de doenças humanas. Esses modelos são

amplamente utilizados na academia e na indústria em ensaios de fármacos, o que representa um grande incentivo para o desenvolvimento de mais modelos, para mais doenças, e o aperfeiçoamento dos modelos já existentes, para que cada vez sejam mais fidedignos com a espécie humana.

Os modelos transgênicos murinos substituíram em parte os animais mutantes espontâneos e induzidos, e a tendência é que conquistem cada vez mais esse espaço. A metodologia de transgênese possibilitou que pesquisadores produzissem diretamente animais com mutações em genes específicos, além dessas mutações poderem ser idênticas ao dos humanos, sempre em busca de fenótipos com maior identidade (Gama-Sousa, 2010). Antes dessa metodologia os pesquisadores obtinham os modelos por meio de raras mutações espontâneas que correspondessem a fenótipos de interesse, ou induziam essas mutações por meio de agentes químicos como o N-etil-N-nitrosourea (ENU) (Chaible, 2010).

Quadro 5- Descrição de alguns dos modelos transgênicos murinos utilizados na pesquisa de doenças humanas.

Doença Humana	Gene	Modelo
Câncer de pulmão	Kras	KrasLA1
	Kras	KrasLA2
	Kras	LSL Kras G12D
	EGFR-L858R	EGFR-L858R
Câncer de próstata	Nkx3-1	Nkx3.1 null (B6; 129)
	Nkx3-1	Nkx3.1-Cre
	Nkx3-1	Nkx3.1-CreERT2
	Nkx3-1	Nkx3.1 null (B6)
Câncer hematopoiético	PML/RARA	PML–RARa
	RARa-PML	RARa-PML
	Myc	Lambda-Myc
Tumores cerebrais	ires-CreER	Pax7(CreERp)
	TA _g	SV11
	TA _g	LPV-TA _g , T121, LST1137, dl1137
	hCDK4	GFAP-hCDK4
	Nf1	Nf1 flox
Tumores gastrointestinais	Ahr	Ahr null
	Apc	Apc1638
	Apc	Apc Delta 580
	Mlh1	Mlh1 null
Tumores ovarianos	Brca1	Brca1 floxed (FVB; 129)
Tumores tireoidianos	HPV16	TG-E6/E7
Tumores de pele	iCre	Langerin-Cre
	HRAS	Tyr-HRAS
	rtTA	Tyr-rtTA
Tumores múltiplos	Rb1	Rb1 null
	Rb1	Rb floxed
	Apc	Apc CKO

Doença Humana	Gene	Modelo	Fenótipo
Síndrome de Marfan	<i>Fbn1</i>	B6.129- <i>Fbn1</i> ^{tm1Had}	Anormalidades cardíacas e esqueléticas
Síndrome de Huntington	<i>Htt</i>	B6.129- <i>Htt</i> ^{tm5Mem}	Anormalidade cerebrais e comportamento anormal
Fibrose cística	<i>Cftr</i>	B6.129P2- <i>Cftr</i> ^{tm1Unc}	Ácinos pancreáticos anormais, morfologia intestinal anormal e fisiologia respiratória anormal
Síndrome do X frágil	<i>Fmr1</i>	FVB; 129P- <i>Fmr1</i> ^{tm1Cgr}	Problemas auditivos, hiperatividade diminuição de reflexos
Hemofilia	<i>F8</i>	B6; 129S- <i>F8</i> ^{tm1Kaz}	Deficiência do fator-8 e coagulação anormal do sangue
Hipertensão	<i>Cyp4a14</i>	129S- <i>Cyp4a14</i> ^{tm1Jhc}	Resistência vascular renal anormal, aumento da pressão sanguínea
	<i>Ren1</i>	129S/SvEv-Tg(Alb1-Ren)2Unc	Aumento da pressão sanguínea, hipertrofia cardíaca
	<i>Adra2b</i>	FVB-Tg(PDGFB-Adra2b)13Hag	Aumento da pressão sistólica
Infertilidade	<i>Hspa2</i>	B6.129P2- <i>Hspa2</i> ^{tm1Dix}	Infertilidade dos machos
	<i>Tnfaip6</i>	C.129S6- <i>Tnfaip6</i> ^{tm1Cfu}	Infertilidade das fêmeas, células do cumulus ausentes, diminuição na taxa de ovulação
Asma	<i>Tbx21</i>	B6.129S6- <i>Tbx21</i> ^{tm1Csm}	Diferenciação anormal das células CD4
	<i>F2rl1</i>	B6.Cg-F2rl1 ^{tm1Mslb}	Diminuição na resposta inflamatória
Esclerose múltipla	<i>Prpf1</i>	C57BL/6- <i>Prpf1</i> ^{tm1Sdz}	Inflamação do SNC, desmielinização
Lúpus eritematoso	<i>C3, Man2a1</i>	B6; 129-C3 ^{tm1Crr} <i>Man2a1</i> ^{tm1Jxm}	Elevação da titulação de anticorpos, hematologia anormal, anemia e nefrite
Artrite	<i>Tia1</i>	B6.129S2(C)- <i>Tia1</i> ^{tm1Andp}	Desenvolvimento de artrite e mais susceptíveis a choques tóxicos
Psoríase	<i>Vegfa</i>	FVB-Tg(KRT14-Vegfa)3Dtm	Desenvolvimento severo de lesões
Arteriosclerose	<i>Alox15</i>	C57BL/6J-Tg(Alox15)41FChed	Arteriosclerose e desenvolvimento espontâneo de problemas aórticos
Diabetes	<i>Apoe, Ins2</i>	B6.Cg- <i>Apoe</i> ^{tm1Unc} <i>Ins2</i> ^{Akita}	Arteriosclerose, Hipercolesterolemia, hiperglicemia

Adaptado de Chaible, et al. 2013.

2.5 O sistema de expressão induzido por tetraciclina

O sistema de expressão induzível por tetraciclina é o sistema de operador naturalmente encontrado em bactérias Gram-negativas resistentes ao antibiótico de mesmo nome. Esse sistema induzível foi desenvolvido por dois pesquisadores da Universidade de Heidelberg em 1992. Hermann Bujard e Manfred Gossen foram os primeiros pesquisadores que conseguiram isolar a sequência genética do promotor e operador de resistência à tetraciclina de bactérias *Escherichia coli* e utilizá-lo em células eucarióticas (Gossen, 1992).

Os dois sistemas de expressão induzível mais comuns disponíveis hoje são baseados nesse primeiro modelo descrito, mas que foram modificados para serem mais efetivos em células de mamíferos. Esses dois sistemas são denominados de Tet-On e Tet-Off e como o nome mesmo sugere ligam e desligam a expressão do gene de interesse de acordo com a presença ou ausência da tetraciclina, respectivamente.

O sistema Tet-Off baseia-se em uma proteína transativadora (tTA) fusionada à uma proteína repressora (TetR). A proteína tTA naturalmente possui afinidade a ligar-se ao DNA, mais especificamente na região operadora TetO que é associada à um promotor viral mínimo CMV, sendo esse complexo denominado pTRE (*Tetracycline Transactivator Element*). Dessa forma sempre a proteína TetR liga-se às regiões TetO presentes no pTRE resultando na expressão do gene downstream à ele. Na presença de tetraciclina (ou o seu análogo mais estável doxíciclina) ocorre uma ligação entre o antibiótico e o tTA que modifica a estrutura da proteína tornando-a incapaz de ligar-se ao promotor pTRE, e assim desativando a expressão gênica (Berens, 2003).

O sistema Tet-On funciona de maneira muito similar ao descrito, porém de maneira oposta. Enquanto no sistema Tet-Off o complexo TetR liga-se espontaneamente à região TetO, no sistema Tet-On houve uma modificação na estrutura da proteína transativadora tTA (agora chamada rTA e rTetR) que se liga à região TetO somente quando ligada à doxíciclina, ou seja, a ativação da expressão ocorre somente na presença do antibiótico. Apesar da similaridade entre os dois sistemas, muitas vezes o sistema Tet-On é preferível, pois na ausência de

doxicilina a expressão do gene de interesse é praticamente zero, enquanto no sistema Tet-Off, na presença de doxiciclina a desativação do gene de interesse não é total (Berens, 2003). A esquematização dos sistemas de expressão podem ser observados na figura 31.

Figura 31- Ilustração esquemática dos sistemas de expressão induzíveis por tetraciclina ou o seu análogo doxiciclina. (A) O sistema Tet-Off é caracterizado pela interrupção da expressão do gene de interesse (vermelho) quando na presença de doxiciclina (DOX). O gene transativador *TetR* (amarelo) é expresso de maneira constitutiva produzindo proteínas sensíveis à doxiciclina. Na ausência do antibiótico a proteína *TetR* possui afinidade pelas regiões TetO (azul) presente dentro do promotor pTRE (verde) ativando assim a expressão do gene de interesse. Na presença de doxiciclina a proteína *TetR* perde a afinidade pelo DNA interrompendo assim a expressão do gene de interesse. (B) O sistema Tet-On é similar ao Tet-Off, porém funcionando de maneira oposta. O gene transativador *rTetR* (amarelo) produz proteínas sensíveis à doxiciclina. Na ausência do antibiótico a proteína *rTetR* não possui afinidade pelas regiões TetO (azul) presente dentro do promotor pTRE (verde) não ativando assim a expressão do gene de interesse. Na presença de doxiciclina a proteína *rTetR* ganha afinidade pelo DNA iniciando assim a expressão do gene de interesse.

O sistema Tet-On é comercializado pela empresa Clontech® que disponibiliza o sistema de expressão induzível em dois diferentes vetores plasmídeos, sendo que um deles contém o sistema de expressão da proteína ativadora rTetR e o outro o promotor induzível pTRE, com sítios de clonagem. A empresa constantemente vem aperfeiçoando o sistema, sendo disponível atualmente a sua terceira geração do sistema, sempre visando melhorar a resposta mediante a doxíciclina, mas principalmente na ausência, pois é muito importante que na ausência da droga a expressão do gene de interesse seja a menor possível (Figura 32A-B) (Loew, 2010).

Outro fator importante que vem sendo constantemente aperfeiçoado é o estímulo de expressão do gene de interesse em baixas doses de doxíciclina. Estudos *in vitro* com o sistema atual mostram que com apenas 10ng/mL já é possível detectar expressão do gene de interesse (LOEW, 2010). Esse sistema de expressão induzido vem sendo empregado amplamente na tecnologia de animais geneticamente modificados, nas mais diversas estratégias. Uma das grandes aplicações, sendo uma ferramenta poderosa, é no sistema de animais knockouts condicionais, onde o sistema induzível regula a expressão da proteína recombinase Cre, resultado na excisão do gene de interesse de maneira temporal (Chaible, 2010; Cox, 2012; Gama-Sousa, 2010).

A obtenção desses animais não é simples, por que os animais são duplos knockouts e para estabilizar a linhagem e cruzamentos, os fundadores devem apresentar os transgenes em homozigose. Cada vetor contendo uma parte do sistema de expressão induzido irá originar um animal transgênico, que por acasalamentos deve ser fixada a homozigose. Posteriormente esses dois animais são acasalados gerando um F1 duplo transgênico em hemizigose, que por acasalamentos são fixados novamente em homozigose, esse animal será considerado o fundador e passará para as gerações o genótipo desejado (Zhang, 2012).

A administração da doxíciclina para os animais é um fator crucial, trabalhos relatam que se pode utilizar praticamente qualquer via de administração, sendo a intraperitonal, por gavagem ou na água de consumo as técnicas mais utilizadas. Na administração intraperitonal usualmente utiliza-se a dosagem de 1 mg/kg de animal (Chen, 2008), na gavagem utiliza-se 1,5 mg/kg de animal (Hojman, 2007), e na água

de consumo na dosagem de 0,2mg/mL de água (Hojman, 2007). A doxíciclina também possui a capacidade de atravessar a barreira placentária e ativar o complexo de expressão ainda em embriões até em fetos (Kolber, 2010).

Figura 32- (A) Quantificação da proteína repórter LacZ expressa sobre o controle induzido do sistema Tet-Off e Tet-On. O primeiro sistema na ausência de Dox produz níveis significativos da proteína repórter, e é desativado pelo fármaco, a situação inversa ocorre no sistema Tet-On. (B) Evolução dos sistemas induzíveis comercializados pela empresa Clontech®. O atual sistema de terceira geração (Tet-On3G) possui menor background de expressão na ausência de Dox, e também possui ativação mais sensível em menores doses do fármaco ativador. (C) O sistema Tet-On3G *in vitro* é ativado com apenas 10ng/mL e a força da transcrição é proporcional à dose de fármaco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo criar um sistema de expressão induzida da Conexina 43 e testar sua eficiência in vitro e in vivo.

3.2 Objetivos específicos

- Construir um sistema de vetores de transgênese que possibilitasse a expressão do gene Cx43 de forma induzida pelo fármaco doxíciclina.
- Estudar o sistema de expressão induzida do gene Cx43 por meio de estudos in vitro.
- Estabelecer a estrutura e adquirir conhecimento dos protocolos de transgênese murina.
- Obter as linhagem de camundongos transgênicos com genótipo pCx43-Tet3G
- Obter a linhagem de camundongos transgênicos com genótipo pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen
- Realizar os cruzamentos dos animais com o intuito de obter o triplo transgênico Cx43Tet.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Engenharia dos vetores de expressão gênica

Os experimentos de construção dos vetores de expressão gênica foram conduzidos no laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, com permissão da CTNBio, sob o número de CQB 100/99.

4.1.1 Obtenção da sequência codificante do gene Cx43

O mRNA total, proveniente de tecidos cardíaco de um camundongo C57BL/6 adulto, rico em Cx43, foi extraído por meio da utilização do kit RNAesy (QUIAGEN – USA), que dispõe de colunas contendo membranas de sílica com afinidade ao RNA. Seguindo o protocolo da empresa, o mRNA foi eluído em 20uL de água DEPC, quantificado por meio do espectro de luz (260nm) e sua integridade observada em gel de agarose 1,5%, por meio da visualização das bandas 18S e 28S.

O RNAm no momento da transcrição reversa foi tratado com DNase I (QUIAGEN – USA) e a partir da fita molde do mRNA sintetizamos o cDNA utilizando a ação da enzima SuperScript II (QUIAGEN – USA) seguindo o protocolo sugerido pela empresa. O cDNA do nosso gene de interesse, Cx43, foi amplificado por meio de PCR utilizando os primers descritos no quadro 6. Esses primers foram sintetizados e purificados via PAGE, visando a integridade do seu desenho e tamanho, evitando problemas de ausência regiões importantes contidas nesses primers. O fragmento de 1146pb foi amplificado inicialmente por PCR utilizando a enzima Accuprime Taq, uma Taq polimerase de alta fidelidade (Invitrogen – USA).

O fragmento a seguir foi clonado no sistema de clonagem TOPO2.1 TA Cloning (Invitrogen - USA) com plasmídios adequados e com sistema de seleção positiva. Por meio da técnica de sequenciamento analisamos a fidedignidade da sequência obtida, em busca possíveis erros na replicação, visando evitar problemas futuros na síntese protéica. Maiores detalhes dessas técnicas serão discutidas adiante.

Quadro 6- Primers de amplificação da sequência codificante do gene Cx43

Primers	
Cloning Cx43 F	Sal I Start Códon GTCGACATGGGTGACTGGAGCGCCTT
Cloning Cx43 R	Sall Stop Códon Epítipo V5 GTCGACTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGG ATAGGCTTACCAATCTCCAGGTCATCAGGCCGA

Reagente	Volume (ul)	Ciclo Térmico
DNA	1,5 (100ng)	94°C – 2min
Buffer II	2,5	94°C – 30s
Primer Forward	0,5 (5pmol)	82°C – 1 min
Primer Reverse	0,5 (5pmol)	68°C – 1 min
Accuprime High Fidelity	0,5	68°C – 6 min
H ₂ O	25 q.s.p	35 ciclos

Sequência dos nucleotídeos utilizados nos primers de amplificação da região codificante do gene Cx43, incluindo sequências acessórias e o ciclo de temperaturas e tempos para a reação de PCR.

4.1.2 Obtenção da sequência promotora pCx43

A sequência promotora do gene Cx43 (pCx43), é muito importante para a expressão condicional das células que naturalmente expressam esse gene, para isso, nos baseamos nas sequências publicadas por Pfeifer (2004) e Bhattacharjee (2009) para obtenção dos primers que amplificarão a sequência contendo pCx43.

Para isso, extraímos DNA genômico da cauda de camundongos C57BL/6 por meio da técnica Salting-out e seguiu-se a amplificação da sequência de interesse por meio de PCR com primers específicos, descritos no quadro 7. A reação de PCR foi conduzida utilizando enzimas de alta fidelidade de amplificação (Accuprime Taq –

Invitrogen USA) e posterior clonagem do fragmento de 2297pb em sistema bacteriano. Novamente por meio da técnica de seqüenciamento analisamos a fidedignidade da seqüência obtida, em busca possíveis erros na replicação, visando manter a integridade da sequência regulatória. Adiante ilustraremos em detalhes as outras técnicas utilizadas

Quadro 7- Primers para amplificação do promotor pCx43

Primers	
Cloning pCx43 F	CGGAACAGGTAGACTCGTGA
Cloning pCx43 R	TGTTTCAAAGTCTGCTGCTGT

Reagente	Volume (ul)	Ciclo Térmico
DNA	1 (60ng)	94°C – 2min 94°C – 30s 66°C – 1 min 68°C – 2 min 68°C – 6 min 35 ciclos
Buffer II	2,5	
Primer Foward	1 (10pmol)	
Primer Reverse	1 (10pmol)	
Accuprime High Fidelity	0,5	
H ₂ O	25 q.s.p	

Sequência dos nucleotídeos utilizados nos primers de amplificação da região promotora pCx43, ciclo de temperaturas e tempos para a reação de PCR.

4.1.3 Clonagem das sequências de interesse

A técnica de clonagem é um recurso poderoso e importante na obtenção dos vetores, pois replica de maneira fidedigna o DNA por meio de baterias E.coli e em quantidade suficiente para realizar várias análises. Utilizamos a linhagem de E. coli DH5α quimiocompetentes como meio de replicação dos vetores.

Para clonar as sequências utilizamos a característica da enzima Taq Polimerase de adicionar de maneira constitutiva uma molécula de Adenina na extremidade 3' do amplicon produzido na PCR. Esse nucleotídeo não pareado com

a fita complementar deixa um sítio de ligação com o nucleotídeo timina encontrado no vetor linear TOPO2.1 (Invitrogen – USA), que possui uma timina não pareada na extremidade 3' ligada à uma topoisomerase.

4.1.3.1 Sequência do vetor de clonagem TOPO2.1

O vetor TOPO2.1 (Invitrogen), figura 33, é um vetor de clonagem linear com timinas nas duas extremidades 3' ligadas a uma molécula da enzima topoisomerase. Esse sítio de clonagem é originado pela interrupção do gene B-galactosidade (LacZ). Dessa forma a sequência a ser clonada quando inserida nesse sítio separa as sequências de promoção e codificação do gene LacZ, inviabilizando a produção dessa enzima pelas bactérias, o que será importante para identificação das colônias positivas.

Figura 33- Ilustração do mapa dos vetores obtidas pelo software CLC WorkBench do vetor de clonagem TOPO2.1. Os dados fornecidos pela empresa Invitrogen foram plotados e através de procedimentos de bioinformática é possível a visualização dos sítios de restrição, regiões para desenho de primers de amplificação e de sequenciamento e verificação do tamanho dos fragmentos obtidos após digestão de enzimática. As setas orientadas representam regiões codificantes ou de regulação. As setas em azul claro indicam os genes de resistência aos antibióticos Ampicilina e Keramicina.

4.1.3.2 *Inserção das sequências de interesse ao vetor de clonagem e transformação bacteriana*

As sequências de interesse, sejam o gene Cx43 ou o promotor pCx43, foram individualmente amplificadas e 1 μ L da reação (aproximadamente 25ng) foi adicionadas à 50ng do vetor TOPO2.1 na presença de 1U de T4 DNA ligase (Invitrogen – USA) e tampão próprio contendo 5mM de ATP e 25% de polietilenoglicol. A reação foi incubada em termociclador a 14°C *overnight* e após esse período 2 μ L da reação de ligação foi adicionada à 25 μ L de bactérias competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen – USA). A transformação bacteriana foi realizada seguindo o protocolo sugerido pela empresa, 30 minutos à 0°C, seguindo de 1 minuto à 42°C e imediato resfriamento a 0°C novamente.

4.1.3.3 *Seleção dos clones positivos*

As bactérias transformadas no item anterior foram plaqueadas em meio de cultivo sólido *Lysogeny Broth Agar* (LB Agar). As placas de petri foram preparadas contendo 20mL de meio LB Agar, 1mg de ampicilina (Gibco –USA) e 2mg de X-Gal (Invitrogen – USA). Após o plaqueamento, as placas foram cultivadas em estufa *overnight* para crescimento e aparecimento das colônias. As colônias que se desenvolveram na presença do antibiótico ampicilina possuíam o nosso vetor de clonagem, porém somente as colônias de coloração branca haviam o vetor de clonagem com a inserção da sequência de interesse. A diferenciação foi feita a olho nú conforme a figura 34.

Figura 34- Placa de petri com meio LB Agar com colônias bacterianas transformadas e selecionadas por ampicilina. As colônias brancas possuem o vetor de clonagem com o inserto (colônias positivas), enquanto as colônias azuis possuem somente o vetor de clonagem circular (colônias negativas).

Os clones positivos foram selecionados e repicados em 5mL de meio LB líquido e cresceram overnight. O pellet de bactérias resultante foi submetido ao protocolo de extração de DNA plasmídeo do kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen – USA). Os plasmídeos purificados foram analisados por sequenciamento para verificação da integridade da sequência e seleção do melhor clone que seguiu as análises seguintes.

4.1.4 Construção dos vetores de transgênese

Comercialmente existem sistemas de expressão que facilitam os procedimentos de construção, diminuindo o número de cortes e clonagens para obtenção do vetor final. Escolhemos o sistema de expressão Tet-ON 3G IRES System (Cat.n. 631166 - ClonTech – USA). Esse sistema contendo 2 vetores, que trabalham em conjunto, é considerado um sistema de última geração por carregar regiões regulatórias mais sensíveis à doxiciclina e portanto resultando em maiores

níveis de expressão da proteína de interesse. Os mapas dos vetores comerciais estão ilustrados na figura 35.

Figura 35- Ilustração do mapa dos vetores obtidas pelo software CLC WorkBench do vetor comercial pTet3G system. Os dados fornecidos pela empresa ClonTech foram plotados e através de procedimentos de bioinformática é possível a visualização dos sítios de restrição, regiões para desenho de primers de amplificação e de sequenciamento e verificação do tamanho dos fragmentos obtidos após digestão de enzimática.

4.1.4.1 Construção do vetor pCx43 Tet3G

O vetor pCMV-Tet3G carrega consigo a sequência codificante da proteína reguladora (rTetR) sensível à doxíciclina (Dox). Como ilustrado na figura 3, no vetor original a proteína reguladora rTetR é controlada pelo promotor viral CMV, sendo ele constitutivo, e sem especificidade celular. Nosso plano é direcionar a expressão do gene de interesse Cx43 nas células que naturalmente expressam o gene, e para isso precisamos modular a expressão do gene ativador rTetR por meio do promotor pCx43.

Sendo assim, foi necessária a remoção região promotora original pCMV, e para isso 1ug do vetor pCMV-Tet3G foi submetido à dupla digestão pelas endonucleases XhoI e EcoRI (Fermentas – USA), seguindo o protocolo do fabricante. Após digestão overnight a solução de digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% do sistema CloneWell (Invitrogen – USA). O fragmento mais pesado contendo aproximadamente 3.550 pares de bases (bp) foi isolado e purificado. Paralelamente a isso, o mesmo procedimento foi realizado com o vetor de clonagem TOPO2.1 que

contém a sequência clonada da região pCx43. O fragmento de aproximadamente 2.380bp dessa reação foi isolado e purificado para seguir a reação de ligação.

A ligação dos fragmentos purificados foi feita adicionando-se 10uL do fragmento pCx43 à 5uL do fragmento do vetor pCMV digerido. A reação foi catalisada pela enzima T4 DNA ligase (Invitrogen – USA) overnight a 14°C (quadro 8) . Após isso, a reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias E.coli DH5α, conforme descrito no item 4.1.3 e cultivadas em meio LB Agar na presença de ampicilina por 12 horas. No dia seguinte foram selecionadas cinco colônias para verificação da inserção e fidedignidade da sequência. A figura 36 exemplifica o mapa do vetor esperado após a substituição do promotor pCMV pelo promotor pCx43.

Quadro 8- Parâmetros utilizados para a reação de ligação na construção do vetor de expressão pCx43 Tet3G.

Reagente	Incubação
5uL Vetor Tet3G (100ng)	14°C por 18 horas
10uL pCx43 (200ng)	
4uL Buffer Ligation	
1ul T4 Ligase (Invitrogen)

Figura 36- Ilustração obtida pelo software CLC WorkBench do vetor comercial pCMV Tet3G modificado após a substituição do promotor pCMV pelo pCx43. Estão ilustradas em as regiões indicadas pelo software as regiões *Open Reading Frames* (ORF) dos genes.

4.1.4.2 Construção do vetor pTRE Cx43-IRES-ZsGreen

O outro vetor que faz parte do sistema original de expressão induzida, o pTRE3G-IRES, contém a sequência de regulação Ptight com afinidade pela proteína reguladora rTetR. Inicialmente pensamos em utilizar o vetor contendo o gene repórter vendido comercialmente, porém nesse vetor o nosso gene de interesse Cx43 deve ser inserido *downstream* ao IRES, deixando assim um resíduo de seis aminoácidos na extremidade N-terminal da nossa proteína alvo. Sabemos que os primeiros 10 aminoácidos presentes na proteína servem como peptídeo sinal para o processamento pós-traducional e envio da proteína para a membrana. Por cautela, resolvemos optar pelo processo mais trabalhoso, porém com a certeza de conservarmos a região de sinalização. Assim optamos pelo vetor bicistronic, que contem dois sítios de clonagem ao redor da sequência IRES.

Para a inserção do gene Cx43, 1µg do vetor pTRE-IRES foi linearizado por meio da digestão overnight da endonuclease Sall (Fermentas – USA). O mesmo foi feito com o vetor de clonagem TOPO2.1 que contém a sequência clonada do gene Cx43.

Após a digestão do vetor TOPO2.1, o fragmento de 1.150bp referente ao gene Cx43 foi obtido por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8% do sistema CloneWell (Invitrogen –USA).

O vetor pTRE-IRES linearizado foi tratado com 5U da enzima fosfatase (*Antartic Phosphatase*, BioLabs – USA) para evitar reações de *self-anneling* do vetor. Após esse processo, fizemos a reação de ligação catalisada por 1U de T4 DNA ligase, contendo 14uL do fragmento Cx43 e 3,5uL do vetor pTRE-IRES linearizado. A reação foi incubada à 22°C por 2 horas e após esse período foi feita a transformação das bactérias e plaqueamento em meio sólido LB Agar. Os clones positivos foram selecionados e foram verificados e sequenciados para escolha do mais fiel ao desenho esperado.

O próximo passo foi inserção do gene repórter ZsGreen downstream ao IRES. Para isso repetimos o mesmo processo anterior, mas dessa vez utilizamos a enzima PstI (Fermentas – USA) para linearização do vetor pTRE Cx43-IRES e isolamento fragmento de 700bp correspondente ao ZsGreen. A reação foi realizada utilizando 18uL do fragmento ZsGreen e 2uL do vetor linearizado, incubamos a 22°C por 2 horas e posterior transformação das bactérias (quadro 9). Selecionamos colônias positivas para serem analisadas e uma delas escolhida. O mapa do vetor pTRE Cx43-IRES-ZsGreen está ilustrado na figura 37.

Quadro 9- Parâmetros utilizados para a reação de ligação na construção do vetor de expressão pTRE Cx43-IRES-ZsGreen

Reagente		Incubação
14uL Cx43	Proporção 3:1	22°C por 2 horas
3,5uL pTRE linearizado		
2uL Buffer Ligation		
1uL T4 Ligase (Fermentas)		
1uL PEG4000

Figura 37- Ilustração obtida pelo software CLC WorkBench do vetor comercial pTRE3G-IRES modificado após a adição dos genes Cx43 e ZsGreen. Estão ilustradas em as regiões indicadas pelo software as regiões *Open Reading Frames* (ORF) dos genes.

4.1.4.3 Reação de sequenciamento para verificação das construções.

Ao final de todas as etapas de ligação, os vetores foram testados para verificação da integridade e fidedignidade das sequências. Para isso os clones bacterianos positivos foram selecionados e expandidos em meio líquido de cultivo LB *overnight*. O DNA plasmideal foi extraído, linearizado e quantificado para posterior reação de sequenciamento, que foi realizada no serviço de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano, no Instituto de Biociências – USP.

As reações foram feitas utilizando o protocolo sugerido pela empresa fornecedora dos kits BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (LifeTechnologies – USA) e a leitura das amostras feitas no aparelho o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems – USA). Os resultados foram submetido ao software CLC WorkBench para alinhamento das sequências e confronto com as sequências depositadas no GeneBank.

Os primers utilizados para as reações de sequenciamento estão descritos no quadro 10.

Quadro 10- Desenho dos primers utilizados na reação de sequenciamento.

Primers	
<i>Regiões de anelamento</i>	<i>Sequência</i>
IRES – Zsgreen F	CTGTAGGTAGTTTGTCCAAT
IRES – Zsgreen R	ACATGTGTTTAGTCGAGGTT
pTRE – Cx43 F	ACCAGTTTACTCCCTATCAG
pTRE – Cx43 R	CATATAGACAAACGCACACC
pCx43 F	CGGAACAGGTAGACTCGTGA
pCx43 R	TGTTTCAAAGTCTGCTGCTGT

Relação dos primers utilizados nas reações de sequenciamento do DNA plasmideal. Os nomes dos primers indicam as regiões de anelamento e sentido de leitura de cada um deles, utilizamos a leitura nos dois sentidos para confrontar os resultados obtidos.

4.2 Teste da funcionalidade do sistema Cx43Tet *in vitro*

Após a obtenção e verificação da estrutura dos vetores, escolhemos os clones positivos que apresentaram melhor fidelidade à sequência predita pelos softwares de bioinformática. Esses vetores foram submetidos a testes *in vitro* para verificar a correta expressão gênica e proteica, para posterior utilização na geração de animais geneticamente modificados.

Para a verificação da expressão utilizamos duas linhagens celulares cultivadas *in vitro*, células E10 (pneumócitos do tipo 2 murino imortalizado que naturalmente expressa Cx43) e células HeLa (linhagem tumoral humana que sabidamente não expressa Cx43).

4.2.1 Cultivo celular

Ambos os cultivos celulares, E10 e HeLa, foram realizados em garrafas de cultura contendo meio de cultura DMEM, ausente de antibiótico, com soro fetal bovino 10%, em ambiente estéril, com atmosfera contendo 5% de CO₂ e 37°C.

As culturas confluentes foram submetidas à separação por meio de solução de PBS contendo 0,05% de tripsina e 0,53mM de EDTA, incubadas a 37°C por 5 minutos. As células foram contadas pelo sistema Countess (Invitrogen – USA) e 10⁶ células foram plaqueadas em placas de seis poços para realização dos testes.

4.2.2 *Transfecção dos vetores para as células cultivadas in vitro*

Utilizamos o método de lipossomos para a transferência dos vetores do meio extracelular para o intracelular das células cultivadas *in vitro*. Esse método também conhecido como Lipofectamina é um lipossomo com características catiônicas que forma um complexo juntamente com o DNA que consegue burlar a natural repulsão da membrana plasmática da célula pelo DNA. Dessa forma o complexo consegue agregar-se à membrana plasmática e é transferido para o interior celular.

Dos diversos produtos comerciais disponíveis, escolhemos o reagente Xfect (Clontech – USA), pois possui grande eficiência para os tipos celulares dos quais trabalhamos, com protocolo rápido e baixa toxicidade celular. A técnica inicia-se com as placas de cultivo de seis poços contendo 1mL de meio de cultivo DMEM nas condições descritas no item 4.2.1 e com 70% de confluências entre as células. Paralelamente dois tubos são preparados, conforme o quadro 11

Quadro 11- Protocolo de transfecção dos vetores para cada poço de células *in vitro*

Protocolo de Transfecção			
Tubo 1		Tubo 2	
Vetor	5ug total	Polímero	1,5uL
	1ug vetor rTetR + 4ug vetor Cx43		
Xfect Buffer	100uL q.s.p.	Xfect Buffer	98,5uL

Procolo para preparação dos vetores para transfecção em células cultivadas *in vitro*; quantidade descrita para cada poço. Utilizamos a proporção 1:4 dos vetores pCx43Tet3G e pTRE Cx43 respectivamente e 0,3uL de polímero para cada uL de DNA utilizado.

Após a preparação dos dois tubos, eles serão misturados na proporção 1:1, agitados vigorosamente por 2 minutos em vortex e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Adiciona-se 200uL do complexo em cada poço contendo 1mL de meio de cultura e incuba-se as células por 4 horas em estufa com condições padrão de cultivo. Após esse período retira-se o meio, lava-se as células com 1mL de meio DMEM e posterior adição de 2mL DMEM enriquecido com FBS 10% para continuação dos experimentos a seguir.

4.2.3 Tratamentos com doxiciclina

Para o teste da funcionalidade do sistema Cx43Tet precisamos estimular a expressão do nosso gene de interesse por meio da doxiciclina, e para isso decidimos trabalhar com três diferentes doses da droga: 0ng/mL, 10ng/mL e 1000ng/mL (ng de doxiciclina/mL de meio de cultura). Ambas as linhagens, E10 e HeLa receberam os mesmos tratamentos, conforme ilustrado na figura 38.

Figura 38- Esquema da distribuição dos tratamentos nas placas de cultivo em cada linhagem celular. Trabalhamos com 3 placas de repetição, totalizando 6 amostras experimentais.

4.2.4 Imunofluorescência

As células E10 e HeLa foram plaqueadas em placas de seis poços contendo no interior uma lamínula de vidro circular de 25mm para que as células crescessem aderidas à ela. As células receberam os tratamentos com doxíciclina até a total confluência e seguiu-se a técnica de imunofluorescência.

As células foram fixadas em metanol (anticorpo anti-V5) e paraformaldeído (anti-Cx43, anti-rTetR, anti-ZsGreen) por 20 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se a permeabilização com leite 5% em PBS contendo 0,1% de Triton por 20 minutos e posterior incubação overnight com anticorpo primário. A revelação das marcações foi feita com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fluoróforo e incubados de 2 horas a temperatura ambiente. Para conservar a capacidade fluorescente utilizamos o anti-fading Vectashield contendo DAPI para coloração dos núcleos celulares em azul. As lâminas foram analisadas em microscopia convencional de luz ultravioleta com filtros específicos e por microscopia confocal. O quadro 12 ilustra as concentrações dos anticorpos utilizados bem como os fluoróforos de cada um deles.

Quadro 12- Relação dos anticorpos utilizados com suas respectivas concentrações

Anticorpos		
Proteína	Anticorpo 1^{ario}	Anticorpo 2^{ario}
Epítipo V5	1:200 (monoclonal) – Invitrogen	1:100 (anti-mouse) TRTC – Vermelho
Cx43	1:100 (monoclonal) – Dako	1:100 (anti-mouse) TRTC – Vermelho
rTetR	1:100 (monoclonal) – Clontech	1:100 (anti-mouse) FITC – Verde
ZsGreen	1:100 (monoclonal) - Clontech	1:150 (anti-mouse) FITC - Verde

4.2.5 Westernblot

Para a estimaco das proteínas de interesse recombinantes utilizamos a técnica do Westernblot. Para tanto, foi feita a extração das proteínas das células utilizando um tampão contendo 60mM Tris-HCl, pH 6.8, SDS a 2%, glicerol a 12%, ditiotretitol 0,1M e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM. A concentração de proteínas neste homogenato foi determinada utilizando-se kit da técnica de Bradford (Bio-Rad – USA) e a leitura realizada em espectrofotmetro  595 nm.

As proteínas foram aquecidas  94°C por 10 minutos para desnaturação da sua estrutura terciária, e resolvidas em eletroforese num gel de poliacrilamida a 12%, com dodecil sulfato de sódio (SDS) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PDVF). Para a imunodetecco do epítipo V5 utilizamos o anticorpo monoclonal anti-V5 1:1000 (Invitrogen – USA) e rTetR anticorpo monoclonal anti-rTetR 1:1000 (Clontech – USA) diluído em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado, aplicados sobre as membranas e incubados overnight a 4°C. Após a incubaco a membrana foi colocada em contato com anticorpos secundários, na diluição de 1:100 por 2 horas a temperatura ambiente, a reação foi revelada com kit ECL Plus de bioluminescência (GE –USA) e a imagem capturada em fotodocumentador utilizando luz UV.

4.2.6 PCR em tempo real

O RNAm total da cultura celular foi extraído por meio da técnica fenol/clorofórmio utilizando o reagente Trizol (Invitrogen - USA) seguindo o protocolo do fabricante, e posterior quantificação no aparelho NanoDrop (Thermo – USA). No início da transformação do mRNA, 1500ng de mRNA total foram tratados com 3U de DNase e incubados à 37°C por 1 hora. O cDNA total dos genes expressos nos tecidos foi obtido pela técnica de transcrição reversa utilizando o kit SuperScript® VILO (Invitrogen – USA) e analisados por meio de PCR em tempo real

Utilizamos o sistema de primers e sondas TaqMan (Life Technologies – USA) que foram desenhados a partir das sequência dos vetores transfectados. Todas as reações foram realizadas em um AB7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems – USA), em triplicata, utilizando um programa de detecção Sequence Detector. As sequências dos primers e sondas utilizados estão descritos no quadro 13.

Quadro 13- Sequência dos primers e sondas utilizados na técnica de PCR em tempo real

Primers e Sondas		
Cx43 recombinante	Primer Foward	TTCCAGCAGAGCCAGCAGC
	Sonda	FAM – AGATTGGTAAG
	Primer Reverse	CTCGGTCTCGATTCTACGT
rTetR	Primer Foward	AATTACTCAATGGAGTCGGT
	Sonda	FAM – ACGACAAGGAA
	Primer Reverse	CCTGTACTGGCACGTGAAGA
ZsGreen	Primer Foward	AATCTGTGTGTGGTCGAAGG
	Sonda	FAM - CCATTTGCCGAA
	Primer Reverse	TTATGTACGGAAACAGGGTTT

4.3 Técnicas de transgênese murina

O ato de produção de camundongos transgênicos corresponde a uma série de protocolos e técnicas que são organizados numa sequência lógica, e todos de igual importância para a obtenção dos animais. Esses protocolos variam desde a obtenção do DNA a ser transferido de maneira extremamente pura até cirurgias e identificação dos animais transgênicos na ninhada nascida. Em um primeiro momento essas técnicas podem parecer simples, porém demandam padronizações, testes e muito treino pessoal. A seguir ilustraremos todos os protocolos utilizados nesse trabalho.

4.3.1 Preparação do DNA

Os vetores utilizados até agora são seguimentos de DNA circulares e auto-replicáveis, porém a partir desse momento há a necessidade de linearizar esse plasmídeo. Essa necessidade se dá pelo fato que ele deverá ser integrado ao genoma do embrião e para isso deve haver sítios de ligação nas extremidades.

Essa linearização foi feita pela simples digestão enzimática utilizando uma endonuclease específica. Para o vetor pCx43-Tet3G utilizamos a enzima XhoI (Fermentas – USA), enquanto na reação do vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen utilizamos a enzima EcoRI (Fermentas – USA). Utilizamos 3ug de cada vetor digerido com 30U da respectiva enzima em reação overnight. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% do sistema CloneWell (Invitrogen – USA) para isolamento do fragmento linearizado. O fragmento foi eluído em 50uL de água ultrapura e qualquer resquício de reagente da eletroforese foi removido na purificação por coluna de sílica do kit QIAquick PCR Purification (Qiagen – USA).

O DNA purificado foi quantificado comparativamente em gel de agarose 1,2% utilizando o marcador de massa molecular *High Mass Ladder* (Invitrogen – USA) e diluído em tampão de microinjeção na concentração de 1,7ug/mL. O tampão de injeção é composto por 7,5mM de Tris-HCl, 0,15mM EDTA em água MilliQ

autoclavada e pH 7.4. Essa solução de injeção foi toda preparada em ambiente estéril e estocada à 4°C por até 30 dias.

4.3.2 Animais

Os animais são um dos fatores mais críticos do projeto de transgênese, pois é vital a sua sanidade para uma boa capacidade reprodutiva e embriões de qualidade para o seguimento das técnicas.

Utilizamos animais F1 híbridos de fêmeas C57BL/6 e machos CBA/J acasalados no biotério de criação do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB – UNICAMP – Campinas, SP). Os animais B6CBAF1 de ambos os sexos de 40 dias foram separados em dois grupos, doadores e receptores dos embriões. Os animais de ambos os grupos pertencem à criação SPF (*Specific Pathogen Free*) do CEMIB receberam ração *ad libitum* durante todo esse período, sendo que para os animais doadores de embrião foram ofertadas sementes oliagenosas (semente de milho e de girassol).

4.3.2.1 Casais doadores de zigotos

A cada rodada de experimentos, dois ou três casais B6CBAF1 foram formados para acasalarem e servirem como doadores de zigotos. Para sincronizar a fase estral e aumentar o rendimento de zigotos as fêmeas foram submetidas ao tratamento hormonal de superovulação. O protocolo está ilustrado na figura 39.

Figura 39- Esquema hormonal para super ovulação de fêmeas de camundongo. A cada rodada de experimentos as fêmeas foram submetidas à injeção intraperitoneal (I.P.) de 5UI de gonadotrofina sérica equina (PMSG - *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* – Sigma – USA) às 14 horas da tarde. Dois dias depois, também às 14 horas da tarde outra I.P. de hCG (Gonadotrofina coriônica humana – Sigma – USA). No dia seguinte, após as 8 horas da manhã os zigotos estão aptos a serem colhidos.

4.3.2.2 Obtenção de fêmeas receptoras

As fêmeas receptoras são parte fundamental para a técnica, pois elas precisam estar fisiologicamente aptas para receberem os embriões, com corpo lúteo formado para manutenção hormonal da gestação e após o nascimento trará todos os cuidados à ninhada. As fêmeas não podem ser capacitadas para serem receptoras, assim precisamos identificar entre o plantel, quais delas estão na fase estro. Por característica da espécie, as fêmeas murinas permitem a cobertura dos machos somente na fase de estro e sendo assim, podemos utilizar essa característica para a identificação das fêmeas receptoras.

A identificação das receptoras é feita pela presença de plug vaginal nas fêmeas, pois indicam que permitiram a cobertura dos machos, porém os machos que utilizamos nessa etapa são férteis, porém vasectomizados.

A cirurgia de vasectomia é um procedimento simples e rápido, será descrito a seguir e ilustrado na figura 40.

- I. Machos de 40 dias de vida foram anestesiados com gás isoflurano.
- II. Os olhos foram cobertos com uma gota de PBS para evitar o ressecamento durante o procedimento.
- III. O animal é colocado com o ventre para cima, é esterilizado por álcool 70% e é feita uma incisão na pele, na região central abaixo dos últimos mamilos (figura 40A).
- IV. É feita uma incisão no músculo do abdômen (figura 40B).
- V. Com uma micro-pinça de ponta redonda se segura o *fat pad* e expõe o testículo direito do animal juntamente com o ducto deferente (figura 40C-D).
- VI. Isola-se o ducto deferente e cauteriza-se o duto em duas extremidades (figura 40E).
- VII. Retorna-se o testículo para o interior do abdômen e repete-se o mesmo procedimento com o testículo esquerdo.
- VIII. Sutura-se o abdômen e a pele do animal, pressiona-se a região ventral do animal para posicionar os testículos na bolsa escrotal novamente.
- IX. Retira-se o animal do anestésico, aplica-se anti-séptico de uso tópico na região do corte e medica-se o animal com 7mg/kg com o analgésico carprofeno subcutâneo. Aguarda-se o retorno do animal.

Figura 40- Fotos da cirurgia de vasectomia de camundongos. (A) Visão ventral do animal; (B) Região de incisão da pele; (C) Exposição do testículo direito do animal; (D) Visão detalhada da região do testículo direito; (E) Detalhe do ducto deferente do animal.

4.3.3 Obtenção dos zigotos

As fêmeas submetidas ao tratamento hormonal de super ovulação foram acasaladas com machos B6CBAF1 férteis no dia dois do tratamento (Figura 39) e no dia seguinte, logo cedo, a cópula foi verificada pela identificação do plug vaginal. As fêmeas prenhes foram eutanasiadas por deslocamento cervical, e utilizando lupas fizemos a remoção do oviduto. Para a obtenção dos zigotos, com ajuda de uma lupa para observação e de uma micropipeta para manipulação (figura 41A), seguimos as seguintes etapas:

- I. Colocamos os ovidutos em meio de cultura M2 (Sigma – USA) contendo 0,3mg/mL hialoronidase (Sigma – USA).
- II. Localizamos a região da ampola (figura 41A) e a perfuramos (figura 41B).
- III. Os zigotos são lavados em meio de cultura M2 contendo hialoronidase para remoção das células do cúmulos (figura 41C-D)
- IV. Após total remoção das células do cúmulos, os zigotos são classificados quanto a fertilização (presença do segundo corpúsculo porlar) e transferidos para meio M16 (Sigma – USA) e cultivados em estufa à 37°C com 5% de CO₂ até o momento da microinjeção.

Figura 41- Protocolo de obtenção e manipulação de zigotos murionos. (A) Ilustração da micro-pipeta utilizada para manipulação dos zigotos, que funciona baseada na sucção ou expulsão do ar por meio do bocal; (B) Visualização do oviduto isolado, com a ampola intumescida em destaque; (C) Visualização da ampola perfurada e expulsão da massa celular contendo células do cúmulo e os zigotos; (D) Imagem dos zigotos cercados por células do cúmulo; (E) Imagem dos zigotos cercados pelas células do cúmulo observados em maior magnificação; (F) Imagem dos zigotos já limpos e prontos para ser microinjetados.

Após lavados os zigotos são cultivados em placas de 35mm (Corning – USA) em gotas de meio M16 (Sigma – USA) imersas em óleo mineral (Sigma – USA). É importante usar uma pequena gota de meio para manter os embriões organizados para facilitar a manipulação e o óleo em volta é utilizado para evitar evaporação do meio e consequente mudança de molaridade e até ressecamento dos embriões. O esquema adotado por nós está ilustrado na figura 42.

Figura 42- Ilustração do sistema de organização dos embriões em gotas em placa de cultivo de 35mm. Pipetamos três gotas de 100uL que servirão para estocar os embriões ainda não microinjetados e uma gota de 250uL que armazenará todos os embriões já microinjetados. Após a pipetagem das gotas completamos a placa com óleo mineral para proteger o meio da evaporação.

4.3.4 Microinjeção pronuclear.

Para obtermos os animais geneticamente modificados precisamos fazer com que o nosso vetor linearizado entre no zigoto e lá se integre ao genoma de forma estável. A forma de entrega escolhida nesse trabalho foi a microinjeção pronuclear. Esse protocolo visa injetar, por meio de uma agulha, o DNA purificado do item 4.3.1 dentro de um dos pronúcleos do zigoto. Para isso precisamos de um sistema de micro-manipulação para controle de dois braços de manipulação, o esquerdo contendo a *holder* que fará a contenção do zigoto e o direito que contém a agulha de

injeção que está preenchida com o DNA purificado. O sistema está ilustrado na figura 43.

Figura 43- Sistema de micromanipulação. (A) Esquema de funcionamento do sistema de microinjeção; (B) Foto do sistema de micromanipulação utilizado da marca Nikon-Narishige – JAPÃO); (C) Em detalhe o sítio de injeção com a holder e agulha mergulhados no meio de cultura.

Utilizando a ponteira Microloader (Eppendorf – Alemanha), aspira-se 2uL da solução de DNA e a transfere para o interior da agulha Femtotips II (Eppendorf – Alemanha) vagarosamente com o intuito de evitar a formação de bolhas no interior. A agulha e a *holder* são posicionados no piso do sítio de injeção e na posição central do campo visual da objetiva de 20X, a agulha deve ser mantida num plano focal ligeiramente acima da holder, o ajuste final das posições é feita utilizando a objetiva de 40X.

Após a calibração do micromanipulador, até 20 zigotos do item 4.3.3 são colocados no sítio de injeção, dentro do campo visual da objetiva de 20X. Os zigotos sofrem injeção individualmente, com o braço esquerdo contendo a holder captura-se um zigoto e eleva-o até o campo focal da agulha. Utilizando a objetiva de 40X

identificam-se os dois pronúcleos e os nucléolos, seleciona-se o pronúcleo melhor posicionado e move-se a agulha de maneira firme e contínua através do zigoto. A agulha deve perfurar a zona pelúcida, a membrana plasmática e a membrana pronuclear para então haver a injeção da solução de DNA de maneira lenta, até a percepção do inflamento do pronúcleo. Os elementos mais importantes da técnica estão ilustrados na figura 44A e na figura 44B mostra-se a fotomicrografia da microinjeção pronuclear.

Figura 44- Protocolo de microinjeção. (A) Ilustração dos elementos mais importantes da estrutura do zigoto que devem ser identificados no momento da técnica; (B) Fotomicrografia do zigoto murino sendo microinjetado.

4.3.5 Cirurgia de transferência dos zigotos

Após a realização das microinjeções, os zigotos foram transferidos para fêmeas receptoras para continuar o desenvolvimento embrionário. Nessa etapa de desenvolvimento, é vital que os zigotos sejam transferidos para o início do oviduto, região conhecida como infundíbulo.

As fêmeas aptas a serem receptoras foram identificadas pela presença do plug vaginal após uma noite de cópula com machos vasectomizados e preparadas para a cirurgia. Antes de iniciar o processo cirúrgico, preparamos a pipeta de microinjeção com os zigotos, transferimos não mais de 20 zigotos para cada um dos

infundíbulos. O esquema de organização da pipeta de injeção esta ilustrado na figura 45.

Figura 45- Esquema do preenchimento da pipeta de transferência para a realização da cirurgia.

A cirurgia foi feita seguindo as etapas descritas a seguir:

- I. As fêmeas doadoras foram pesadas e anestesiadas utilizando a droga Avertin (Tribromoetanol, 250mg/kg)
- II. Após a insensibilização pingamos uma gota de PBS em cada um dos globos oculares e é feita a assepsia da região com álcool 70%.
- III. O animal foi colocado na posição dorsal e foi feita a tricotomia da região (figura 46A)
- IV. É feita uma incisão na pele no flanco do animal (figura 46B)
- V. Localizamos o ovário através da transparência do músculo e fazemos uma pequena incisão de 5mm no músculo, evitando qualquer vaso próximo (figura 46C)
- VI. Com uma pinça de ponta romba segurou-se o *fat pad* e expõe-se o ovário e o oviduto.
- VII. Cuidadosamente corta-se a bursa, membrana que envolve o ovário. É muito importante evitar o rompimento de qualquer vaso, pois a região é muito vascularizada (figura 46D)
- VIII. Com uma pinça abre-se espaço entre o ovário e o oviduto para localização da entrada do ducto, o infundíbulo (figura 46E)
- IX. Após a identificação do infundíbulo, delicadamente com uma micro-pinça verifica-se se a abertura não esta colabada e a prepara para a inserção da pipeta contendo os zigotos.

- X. Gentilmente insere-se a pipeta no interior e com a pinça impede a saída de qualquer líquido. Vagarosamente injeta os embriões dentro do oviduto (figura 46F)
- XI. O sucesso da transferência é observado pela presença de bolhas de ar dentro da ampola, e a ampola inflada (figura 46G)
- XII. Cuidadosamente internaliza-se o ovário e o oviduto para dentro do abdômen e sutura-se o corte (figura 46H)
- XIII. Se necessário o mesmo procedimento pode ser realizado no outro ovário.
- XIV. Após o término da cirurgia usa-se um antisséptico tópico na região do corte e o animal é recuperado em ambiente aquecido até o retorno da mobilidade.

Figura 46- Protocolo de transferência de zigotos para a fêmea receptora. (A) O animal é anestesiado e é feita a tricotomia da região; (B) É feita a incisão na pele na região lateral; (C) Próximo do útero é feito um corte no músculo evitando vasos sanguíneos; (D) O útero e oviduto é exposto e delicadamente rompe-se a bursa; (E) Gentilmente localiza-se o infundíbulo ; (F) Introduz a pipeta contendo os zigotos; (G) Injeta-se os zigotos até observar a bolha no interior da ampola; (H) Sutura-se o animal.

Adaptado de Cho, 2011

4.3.6 Genotipagem para identificação dos animais transgênicos

A etapa de genotipagem para identificação do transgene no genoma do animal é uma das etapas mais importantes da técnica, pois é de extrema importância que a estratégia adotada seja prática, rápida e barata, pois muitos animais são testados. O *screening* inicial para identificação do animal transgênico que adotamos foi por meio da utilização da técnica de PCR. Para isso os animais no momento do desmame foram numerados por cortes nas orelhas, seguindo padrão internacional, e esse tecido foi utilizado para extração de DNA.

Os tecidos foram lisados com o acréscimo de 200uL de tampão de lise (pH 8,0) acrescido de proteinase K (Life Technologies), na proporção de 1,5mg/mL de solução. A composição do tampão de lise pode ser observada no quadro 14.

Quadro 14. Composição do tampão de lise utilizado para a extração do DNA genômico para a realização da genotipagem dos animais.

Tampão de Lise
Tris HCl 50 mM pH 8,0
EDTA 10 mM pH 8,0
SDS 0,5%
H ₂ O MiliQ
Proteinase K 1,5 mg/mL

A solução foi mantida por 2 horas em banho-maria à 65oC para otimizar a lise celular. Após esse período, adicionou-se 200uL do tampão de lise sem proteinase K, o qual foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.000 RPM e à 4oC, durante 20 minutos. Para precipitação do DNA, cerca de 300uL do sobrenadante foi transferido para outro

tubo contendo 400uL de etanol absoluto e 20uL de acetato de sódio 3M. As amostras foram novamente centrifugadas a 6.000 RPM à 4°C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a lavagem e nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, o pellet foi diluído com 200uL de TE pH 7,5 (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM). A solubilização do DNA foi realizada em banho maria a 65°C, por 30 minutos, e sua quantificação 260/280nm foi realizada no aparelho BioPhotometer Eppendorf® utilizando diluição de 1:20 em TE.

4.3.6.1 Genotipagem dos animais pCx43-Tet3G

Os animais que receberam microinjeções contendo o vetor pCx43-Tet3G foram analisados conforme o protocolo de PCR descrito no quadro 15.

Quadro 15- Relação de primers utilizados na genotipagem dos animais pCx43-Tet3G

Primers	
pCx43_Fw	TACATCTAGAGCTATTTTC
pCx43_Rv1	GCCAGTACAGGGTAGGCTGC
pCx43_Rv2	CATCAATGTATCTTATCATG

Reagente	Volume (ul)	Ciclo Térmico
DNA	1 (60ng)	94°C – 2min 94°C – 30s 58°C – 1 min 72°C – 1 min 72°C – 2 min 35 ciclos
Buffer	2,5	
Primer Foward	2 (10pmol)	
Primer Reverse	1 (10pmol)	
TaqPolimerase	0,5	
H ₂ O	25 q.s.p	

Os resultados esperados dessa reação eram duas bandas de amplificação contendo 450bp e 1100bp, sendo que caso houvesse necessidade de rápida confirmação da sequência amplificada, temos um sítio de restrição EcoRI em ambos os amplicons. O mapa do vetor, bem como as regiões de desenho dos primers estão ilustrados na figura 15A.

4.3.6.2 Genotipagem dos animais pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen

Os animais que receberam microinjeções contendo o vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen foram analisados conforme o protocolo de PCR descrito no quadro 16.

Quadro 16- Relação de primers utilizados na genotipagem dos animais pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen

Primers		
pTRE_Fw	CCCACGCCCAGCCGTTTGAT	
pTRE_Rv1	CTGCTTCCTTCACGACATTC	
pTRE_Rv2	TTGTCATTTCTTTTGTTAG	

Reagente	Volume (ul)	Ciclo Térmico
DNA	1 (60ng)	94°C – 2min 94°C – 30s 55°C – 1 min 72°C – 1 min 72°C – 2 min 35 ciclos
Buffer	2,5	
Primer Foward	2 (10pmol)	
Primer Reverse	1 (10pmol)	
TaqPolimerase	0,5	
H ₂ O	25 q.s.p	

Os resultados esperados dessa reação eram duas bandas de amplificação contendo 460bp e 900bp. O mapa do vetor, bem como as regiões de desenho dos primers estão ilustrados na figura 47A-B.

Figura 47- Mapa dos vetores de transgênese utilizados com as regiões de cada um dos primers utilizados para genotipagem.

4.4 Estratégia de acasalamento para obtenção do modelo transgênico

O objetivo final do nosso trabalho é obter um animal que é um triplo transgênico, ou seja, ele albergará em seu genoma três construções genéticas, que em conjunto servirão como modelo de pesquisa.

Para chegarmos nesse modelo final, partiremos de três diferentes linhagens, em que cada uma delas carrega uma única construção, e a partir de acasalamentos direcionados, fixaremos o genótipo em homozigose para que os animais parentais passem sua herança genética também em homozigose para os descendentes.

Os dois animais produzidos nesse trabalho, o pCx43-Tet3G e o pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen serão acasalados para obter uma geração F1 que contenha ambos os vetores em hemizigose, chamaremos essa geração de Cx43Tet. Os animais Cx43Tet^{+/-} serão acasalados entre si para fixar o genótipo e ambos os transgênese estejam em homozigose, Cx43Tet^{+/+}.

Os animais Cx43Tet^{+/+} acasalaram-se por sua vez com os animais hemizigotos knockouts para Cx43 (Cx43^{+/-}). Os animais dessa geração F1 que

possuírem o genótipo $Cx43Tet^{+/-}Cx43^{-/-}$ serão acasalados novamente entre eles para obtenção da homozigose dos transgenes e até chegarmos no nosso genótipo de interesse $Cx43Tet^{+/+}Cx43^{-/-}$ que será o fundador da colônia dos animais geneticamente modificados. Para facilitar a compreensão do sistema de acasalamento, ilustramos na figura 48.

Figura 48- Ilustração do esquema de acasalamento final para obtenção do nosso modelo definitivo, um animal que carrega três diferentes construções em seu genoma. (A) Esquema de obtenção dos modelos transgênicos pCx43-Tet3G e pTRE-Cx43. (B) Os animais obtidos no item A são acasalados para obtenção da geração F1 duplo transgênico ($Cx43Tet$) e posterior acasalamento entre os F1 para geração de animais F2 homozigotos para os transgênes ($Cx43Tet^{+/+}$). (C) Acasalamento dos animais knockouts $Cx43^{-/-}$ com os animais $Cx43Tet^{+/+}$ para obtenção do triplo transgênico. (D) Acasalamento dos animais do item C para obtenção dos animais fundadores de genótipo de interesse $Cx43Tet^{+/+}Cx43^{-/-}$. As fêmeas desse ultimo acasalamente necessitam de doxiciclina para a reversão do fenótipo letal dos fetos $Cx43Tet^{+/+}Cx43^{-/-}$.

5 RESULTADOS

5.1 Construção e validação do vetor pCx43Tet3G

5.1.1 Amplificação e clonagem da região promotora pCx43

O promotor pCx43 é a região genômica presente upstream ao start códon responsável pelo controle transcricional do nosso gene de interesse. Devido à falta de estudos que delimitam o início e final desse promotor, nos baseamos nos trabalhos de Pfeifer (2004) e Bhattacharjee (2009) para conseguirmos informações importantes para a identificação dessa região.

Para a construção dos primers que amplificaram a região fizemos um estudo prévio da região upstream ao nosso gene de interesse, e por meio da bioinformática localizamos uma região TATA Box distante 2000 pares de base upstream ao start códon do gene Cx43. Após essa localização desenhamos os primers já descritos no item 4.1.2, o que resultou num amplicon de 2.287bp. Após a padronização da reação de amplificação obtivemos as bandas ilustradas na figura 49A.

Figura 49- Imagem do gel de agarose 1.5% em TAE resultante da eletroforese. (A) produtos de PCR amplificado da região pCx43. (B) Clones TOPO2.1 contendo a sequencia pCx43 inserida, utilizamos o vetor na digerido como referencia e ao lado o plasmídeo digerido com a enzima BamHI. Os clones não orientados apresentam fragmentos de 5663bp e 553bp; e clones orientados fragmentos de 4392bp e 1824bp.

Após a amplificação, a região pCx43 foi clonada em bactérias *E. coli* DH5 α utilizando o vetor TOPO2.1, como descrito no item 4.1.3 e selecionamos 12 clones positivos. Esses clones tiveram o DNA plasmideal analisado por meio de digestão enzimática com a enzima BamHI para verificação da orientação de inserção no vetor TOPO2.1. Checar essa orientação foi de fundamental importância pois era nosso interesse utilizar os sítios de restrição presentes nesse vetor para realizar a clonagem seguinte. Dessa forma obtivemos dois padrões na eletroforese: Clones positivos não orientados com dois fragmentos de 5663bp e 553bp; e clones positivos orientados com dois fragmentos de 4392bp e 1824bp (Figura 49B). Somente esse segundo caso, os clones orientados deram prosseguimento nas análises.

O segundo passo foi identificar dentre os cinco clones orientados aquele que continha a sequência mais fidedigna à sequência de referência depositada no GeneBank. A figura 50 ilustra o resultado do sequenciamento obtido do clone selecionado para o seguimento dos experimentos. Dos clones analisados o clone número 3 foi o que apresentou menor número de incorreções quando comparado com a sequência pCx43 de referência. Os outros clones apresentaram maiores taxas de incorreções sendo de 7% para o clone 4; 4% para o clone 5; 9% para o clone 6 e 5% para o clone 10.

Figura 50- Figura ilustrativa da análise dos contigs obtidas pela técnica de sequenciamento. O clone 3 ilustrado na figura foi sequenciado e o resultado alinhado com a sequência depositada no GeneBank para comparações. Dos 2,2kb totais da região, sequenciamos aproximadamente 1,1kb situados nas duas extremidades do amplificado. A taxa de incoerência entre o nosso clone e a sequência depositada de referencia foi menor que 2%.

5.1.2 Construção do vetor de transgênese pCx43-Tet3G

O sistema da Clontech que adquirimos possui o gene ativador rTetR regulado pelo promotor viral pCMV. Como o nosso objetivo é criar um animal com a expressão condicional mais próximo possível no natural, decidimos condicionar a expressão do gene ativador pelo mesmo promotor do nosso gene de interesse, ou seja, o pCx43. Dessa forma somente as células que naturalmente expressam o gene Cx43 expressarão o nosso gene recombinante, e para isso, a primeira etapa para a construção do nosso vetor de transgênese é a substituição do pCMV pelo pCx43.

Após a dupla digestão enzimática o vetor sofreu três diferentes cortes que originaram três diferentes fragmentos, isso resultou na retirada definitiva de uma região do vetor (região C da figura 51), essa região contém o complexo gênico que confere resistência celular aos antibióticos Neomicina e Keramicina. Outra região excisada foi o promotor pCMV (região A da figura 51) que era o nosso objetivo. A região B (figura 51) é a que contém a sequência do gene rTetR e foi a região que foi isolada do gel para seguir em frente na estratégia, ela é quem receberá o novo promotor.

Figura 51- Mapa do vetor pCMV-Tet3G indicando as regiões regulatórias e codificantes do vetor e os sítios de restrição utilizados na digestão para retirada do promotor pCMV e ao lado a imagem do gel de agarose 1% em TAE resultante da eletroforese dos vetores pCMV-Tet3G digeridos com XhoI e SacI. Marcador 1Kb Ladder (Invitrogen). (A) fragmento com 673bp; (B) fragmento com 3.547bp; (C) fragmento com 2.933bp.

O clone 3 contendo pCx43 clonado em TOPO2.1 selecionado anteriormente também foi digerido com XhoI e SacI e o fragmento mais leve correspondente somente à sequência pCx43 foi purificada e ligada ao fragmento purificado B da figura 51 seguindo o protocolo descrito no item 4.1.4.

Após a reação de ligação e transformação em bactérias *E. coli* DH5 α obtivemos dezenas de clones positivos, dentre eles cinco foram selecionados e tiveram o DNA plasmideal avaliado. Nos cinco clones analisados conseguimos identificar a inserção região pCx43, mas precisamos verificar também a correta orientação do fragmento. Para isso o DNA plasmideal foi submetido à dupla digestão enzimática com as enzimas BamHI e XbaI, resultando em 4 diferentes fragmentos conforme ilustrado na figura 52. Os clones com desenho desejado, ou seja, com o inserto pCx43 orientado devem apresentar um padrão de bandas de fragmento de tamanhos 3.194bp, 1.481bp, 756bp, 225bp.

Todos os cinco clones analisados apresentaram o padrão de tamanho de bandas esperado, dessa forma consideramos que nesses cinco a inserção da sequência pCx43 foi orientada e assim qualquer um deles pode ser utilizado. Após essa etapa de sucesso nós consideramos esse vetor pronto para início dos testes *in vitro*

Figura 52- Ilustração do mapa do vetor pCx43-Tet3G com as regiões de corte e gênicas identificadas. O vetor após digestão com as enzimas BamHI e XbaI devem apresentar um padrão de bandas específico para termos certeza da correta orientação da inserção da sequência pCx43. O fotografia do gel de agarose 1,5% ilustra os 5 clones positivos selecionados que sofreram a dupla digestão enzimática.

5.1.3 Testes *in vitro* do vetor pCx43-Tet3G

Após a confirmação da estrutura do nosso vetor de transgênese pCx43-Tet3G o próximo passo foi verificar sua funcionalidade. Esse vetor deve ser funcional, ou seja, expressar a proteína ativadora rTetR nas células em que naturalmente o gene Cx43 é expresso, já que sua expressão é modulada pelo promotor pCx43.

Com esse objetivo testamos três dos clones positivos ilustrados na figura 52 em duas diferentes linhagens celulares, células HeLa e células E10. As células HeLa são uma linhagem neoplásica de carcinoma uterino humano que sabidamente não expressam nenhum tipo de conexina, entre elas a Cx43; já as células E10 fazem parte de uma linhagem celular murina, imortalizada, não tumoral e proveniente de pneumócitos do tipo II, que sabidamente expressam Cx43.

Sendo assim, nesses testes *in vitro* utilizamos as células HeLa como controle de seletividade de expressão por parte do promotor pCx43 e utilizamos o vetor original pCMV—Tet3G que contém o promotor viral pCMV regulando a expressão da proteína ativadora rTetR como controle positivo de expressão e de detecção.

Depois da transfecção das células com os vetores realizamos as reações de imunodetecção, tanto *in situ* pela imunofluorescência como por Western blot. Ambas as linhagens que receberam o vetor de controle pCMV-Tet3G expressaram a proteína rTetR e conseguimos detectá-las tanto na região citoplasmática, quanto no complexo de Golgi (Figura 53C-D). Já o nosso vetor de interesse quando transfectado para as células HeLa não apresentaram expressão, esse resultado corresponde com o esperado pois essas células não apresentam expressão do gene Cx43 (Figura 53E). O mesmo vetor pCx43-Tet3G quando transfectado para células E10 apresentaram altos níveis de expressão do gene rTetR, comprovando mais uma vez a sua correta funcionalidade (Figura 53F).

Os resultados ilustrados na figura 53 são referentes à apenas um dos clones pCx43-Tet3G, porém todos os clones foram analisados e apresentaram resultados semelhantes. Nós ainda realizamos as análises da detecção da proteína rTetR por meio da técnica de Western blot. Os resultados obtidos nessa técnica foram compatíveis com os encontrados na imunofluorescência. Os vetores de controle pCMV-Tet3G apresentaram expressão e tradução do gene rTetR em ambas as

linhagens celulares, HeLa e E10; já os clones dos vetores pCx43-Tet3G expressaram o mesmo gene somente na linhagem E10 (Figura 54).

Após detectarmos a proteína rTetR expressa pelos vetores, tanto o vetor controle pCMV-Tet3G quanto o de interesse pCx43-Tet3G foram testados novamente para verificar os níveis de mRNA produzidos por cada um deles nas diferentes linhagens celulares. Precisávamos saber se fato de não detectarmos proteínas rTetR derivadas do vetor pCx43-Tet3G em células HeLa estava relacionado com processos de transcrição ou tradução dessa linhagem em específica. Para isso por meio da técnica de Real Time PCR quantificamos de maneira relativa o nível de expressão gênica do gene rTetR. Para isso normalizamos os dados absolutos obtidos desse gene de interesse com outro gene também expresso no mesmo vetor, o gene de resistência à ampicilina AmpR.

Como ilustrado nos gráficos da figura 55, nas células HeLa somente o vetor pCMV-Tet3G transcreveu mRNA referente ao gene rTetR, enquanto não obtivemos níveis significantes de transcritos pelo vetor pCx43-tet3G. Nas células E10, novamente ambos os vetores apresentaram resultados positivos. Dessa forma podemos pressupor que é um problema transcricional e que de alguma forma, nas células HeLa, o promotor pCx43 é suprimido via metilação de ilhas CpG ou condensação de cromatina.

Figura 53- Fotomicrografia do resultado da técnica de imunofluorescência para a proteína rTetR modulada pela expressão dos vetores pCMV-Tet3G (controle positivo) e pCx43-Tet3G. Os núcleos celulares estão marcados com o fluoróforo DAPI (azul) enquanto as proteínas rTetR marcadas com FITC (verde). (A) Controle negativo da reação, células HeLa transfectadas com o vetor pCMV-Tet3G que não foram incubadas com o anticorpo primário anti-rTetR. (B) Controle negativo da reação, células E10 transfectadas com o vetor pCMV-Tet3G que não foram incubadas com o anticorpo primário anti-rTetR. (C) Células HeLa com pCMV-Tet3G

expressando rTerR. (D) Células E10 com pCMV-Tet3G expressando rTetR. (E) Ausência da expressão de rTetR em células HeLa com pCx43-Tet3G. (F) Células E10 com pCx43-Tet3G expressando rTetR. Barra de escala 5um.

Figura 54- Fotografia do resultado da imunomarcaco da proteína rTetR pela técnica de Western blot utilizando o sistema de revelao ECL-Plus. (A) Nas células HeLa, somente o vetor pCMV-Tet3G expressou o gene rTetR, não havendo deteco nas células HeLa transfectadas pelo vetor pCx43-Tet3G. (B) Deteco em células E10 transfectadas, sendo que ambos os vetores expressaram a gene rTetR.

Figura 55- Gráficos resultantes do estudo da expressão do gene rTetR pela técnica de Real Time PCR. O gene de interesse rTetR foi quantificado relativamente, e para isso utilizamos o gene AmpR como normalizador. (A) Quantificao dos níveis de mRNA do gene rTetR nas células HeLa em

função dos diferentes clones de vetores, utilizamos os vetores pCMV-Tet3G como controle e testamos a expressão nos vetores pCx43-Tet3G. (B) Quantificação dos níveis de mRNA do gene rTetR nas células E10 em função dos diferentes clones de vetores, utilizamos os vetores pCMV-Tet3G como controle e testamos a expressão nos vetores pCx43-Tet3G.

Esses resultados indicam a correta funcionalidade dos vetores e que acertamos na escolha da região genômica que o pCx43 está naturalmente localizado. Os vetores presentes nos clones analisados apresentaram expressão satisfatória do gene ativador rTetR e a detecção da sua proteína correspondente foi detectada em quantidade adequada ao esperado. Além disso, a seletividade da expressão modulada pelo promotor pCx43 aparentemente foi mantida, pois nenhum traço da proteína rTetR foi detectada nas técnicas de western blot e de Real Time PCR. Com esses resultados ainda não é possível afirmarmos categoricamente que o promotor pCx43 por nós clonado apresenta a mesma seletividade biológica do pCx43 original, esses resultados serão obtidos apenas estudando a expressão *in vivo* no animal geneticamente modificado aqui proposto.

5.2 Construção do vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen

5.2.1 Amplificação e clonagem da região codificante do gene Cx43.

O vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen é o segundo vetor de expressão que construímos e juntamente com o vetor pCx43-Tet3G fará parte do sistema induzível de expressão Cx43Tet. O primeiro passo para isso foi a obtenção da sequência codificante do gene Cx43. Como já descrito anteriormente, partindo do mRNA total obtivemos o cDNA de todos os transcritos. A sequência codificante de interesse, contendo 1.146bp foi amplificada pela técnica de PCR utilizando enzima de alta fidelidade, utilizando os primers descritos no item 4.1.1 (figura 56A).

Esse fragmento foi clonado em vetor TOPO2.1 e das dezenas de clones positivos apenas seis foram selecionados para análise. Esses seis clones foram submetidos à PCR utilizando os mesmos primers do item 4.1.1 para confirmação da inserção do fragmento (figura 56B). Como era esperado todos os clones positivos

realmente possuíam o fragmento de 1.146bp referente ao gene Cx43, mas precisávamos escolher um deles para continuar na construção.

Para fazer essa escolha, os plasmídeos desses seis clones positivos foram analisados pela técnica de sequenciamento para verificar qual deles possuía mais homologia com a sequência de referência depositada no GeneBank. Utilizamos primers M13 para amplificar ± 20 bp externos à região clonada Cx43, e assim poderemos sequenciar de maneira adequada o início e fim do inserto, confirmando a integridade dos sítios de restrição, o start códon e o stop códon.

Figura 56- Imagem do gel de agarose 1% em TAE resultante da eletroforese. (A) Amplificação por PCR da sequência codificante Cx43 utilizando diferentes temperaturas de anelamento, o amplicom esperado é de 1.146bp. Marcador molecular High DNA Mass com seus respectivos tamanhos (B) Confirmação da inserção do fragmento clonado em seis clones positivos selecionados aleatoriamente. Cada clone foi linearizado para confirmação do tamanho e feita a PCR para detecção da inserção do fragmento.

A fidelidade da sequência codificante é de extrema importância, pois qualquer modificação nos nucleotídeos levará a alteração de códon e por consequência na composição da proteína. Dessa forma para eliminarmos qualquer erro da técnica de sequenciamento, cada clone foi sequenciado cinco vezes e por análise em software de bioinformática conseguimos excluir esses possíveis erros, chegando assim ao clone mais fiel à sequência de referência.

A predição do fragmento amplificado era de 1.160bp, mas na reação de sequenciamento conseguimos amplificar por volta de 1Kb com qualidade, e desses resultados, após análise dos softwares escolhemos o clone número 2 para dar seguimento dos vetores de expressão. O clone 2 apresentou apenas três

nucleotídeos incorretos em relação à referência, sendo que uma das trocas resultou em mesmo aminoácido. Esse clone também apresentou as regiões de extremidade integras, com conservação dos sítios de restrição Sall e também o start e stop códons. O resultado da análise de sequenciamento pode ser observada na figura 57.

Figura 57- Figura ilustrativa da análise dos contigs obtidas pela técnica de sequenciamento. O clone 2 ilustrado na figura foi sequenciado e o resultado alinhado com a sequência depositada no GeneBank para comparações.

5.2.2 Obtenção e clonagem do gene repórter ZsGreen.

Nesse trabalho escolhemos utilizar o gene repórter ZsGreen pois o tradicional eGFP é incompatível com o sistema de expressão TetON. Essa incompatibilidade é dada pela coincidência de enzimas de restrição entre o vetor pTRE-IRES e o gene eGFP, impossibilitando assim a clonagem.

Utilizamos o vetor comercial de mesmo nome proveniente da Clontech, sendo que a sequência codificante de 696bp foi facilmente obtida por meio da digestão com a enzima XbaI e posterior purificação para clonagem (figura 58A). O fragmento ZsGreen foi clonado em vetor TOPO2.1, porém sua inserção deve ser corretamente orientada, pois em nosso plano inicial precisávamos dos sítios de restrição PstI presentes no vetor de clonagem. Dos clones positivos selecionamos três para análise de orientação do inserto. O vetor com orientação desejada quando digerido pela enzima EcoRV deveria apresentar um fragmento de 150bp (figura 58B). Dessa forma dos três clones testados dois possuíam a orientação desejada, sendo que o clone 2 foi o escolhido para prosseguir na construção.

Nesse caso, não foi necessário realizarmos experimentos de sequenciamento para verificar a integridade da sequência do gene, pois as colônias positivas apresentavam fenótipo verde, conferido pelo gene ZsGreen expresso por elas, evidenciando assim a correta funcionalidade da proteína.

Figura 58- Imagem do gel de agarose 1% em TAE resultante da eletroforese. (A) Digestão com XbaI do vetor ZsGreen para isolamento da região gênica codificante correspondente à 696bp. (B) Confirmamos a orientação da inserção no vetor de clonagem por meio da identificação de uma banda de 150bp após da digestão com EcoRV.

5.2.3 Contrução do vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen

Após clonarmos as sequências dos genes Cx43 e ZsGreen, o próximo passo que realizamos foi a inserção dessas sequencias no vetor que alberga a estrutura de expressão condicional, principalmente o promotor induzível pTRE.

A primeira sequência que inserimos foi a codificante do gene Cx43, ela foi ligada ao vetor no primeiro sítio de clonagem downstream ao promotor pTRE. Para isso, tanto o vetor de clonagem TOPO2.1 contendo a sequência Cx43, quanto o vetor pTRE-IRES original foram digerido pela enzima Sall. Dessa forma, no vetor de clonagem obtivemos duas bandas, sendo que a de 1.160 corresponde à sequência do gene Cx43 que foi purificada para ligação no vetor linearizado pTRE-IRES (figura 59A).

Conforme descrito no item 4.1.4 prosseguimos com a ligação do inserto ao vetor linearizado, porém percebemos que a frequência de ligação era baixa, mesmo com o tratamento de fosfatase no vetor. Assim, para identificarmos os clones que albergavam o plasmídeo com a inserção do gene Cx43 realizamos um screening de colônias pela técnica de PCR, utilizando primers para o gene Cx43. Os clones

positivos apresentaram uma banda de aproximadamente 1.100bp referente ao gene Cx43 inserido (Figura 59B).

Figura 59- Imagem do gel de agarose 1% em TAE resultante da eletroforese. (A) Digestão do vetor de clonagem TOPO2.1 contendo o gene Cx43 pela enzima Sall. A banda mais leve de 1.160bp é referente ao fragmento que foi inserido no vetor pTRE-IRES linearizado.(B) Resultado do screening de colônias para identificação das positivas para Cx43. As consideradas positivas foram as que apresentaram banda de 1.100bp.

Analizamos 40 colônias, sendo que apenas duas delas apresentaram o gene Cx43 inserido ao vetor. Provavelmente essa baixa eficiência foi dada pelo self-annealing do vetor pTRE-IRES, reduzindo assim o número de possibilidades de ligação do vetor ao inserto. Devido termos escolhido a mesma enzima Sall para corte nas duas extremidades do inserto Cx43 ainda precisamos verificar se a sua inserção foi orientada, pois há a probabilidade da clonagem ter sido realizada invertida, o que resultaria numa proteína completamente diferente da Cx43.

Para verificar a orientação da inserção submetemos os dois clones positivos identificados à digestão pela enzima SacI. O padrão de corte para o inserto orientado seria 2 bandas leves de 436bp e 349bp (figura 60A), enquanto o vetor invertido apresentaria também duas bandas porém de 613bp e 349bp (figura 60B).

Figura 60- Estratégia para verificação da orientação do inserto Cx43 no vetor pTRE-IRES. A) Mapa do vetor ilustrando os sítios de corte por *SacI* no vetor com o inserto Cx43 orientado. (B) Mapa do vetor ilustrando os sítios de corte por *SacI* no vetor com o inserto Cx43 não orientado. (C) Imagem do gel de agarose 2% em TAE como resultado da verificação da orientação obtido pela digestão dos clones identificados como positivos na figura 59. Apenas um dos clones estava orientado. Nota-se no clone orientado uma banda de peso intermediário de aproximadamente 800bp, que é resultado da digestão incompleta.

Esses dois clones ainda foram submetidos a mais um teste, dessa vez por amplificação com PCR utilizando primers específicos. O primeiro par de primers amplifica uma banda de 477bp nos clones com o inserto Cx43 orientados, e nenhuma banda nos clones invertidos; já o segundo par de primers foi utilizado para identificar somente os clones com o inserto Cx43 invertido, dessa forma esses clones apresentariam uma banda de 611bp amplificada, enquanto no clone orientado nada seria amplificado.

Dessa forma, assim como no teste da digestão ilustrado na figura 60, confirmamos que o clone número 2 possuía o nosso gene de interesse Cx43 clonado no vetor pTRE-IRES de maneira orientada, dessa forma confirmamos o sucesso da construção e obtenção do vetor pTRE-Cx43-IRES.

Figura 61- Estratégia para verificação da orientação do inserto Cx43 no vetor pTRE-IRES. A) Mapa do vetor ilustrando a região amplificada no vetor que possui o inserto Cx43 orientado, com a respectiva foto do gel de agarose 1% dos clones amplificados, sendo que apenas o clone 2 apresentou a banda de 477bp confirmando ser positivo. (B) Mapa do vetor ilustrando a região amplificada no vetor que possui o inserto Cx43 não orientado, com a respectiva foto do gel de agarose 1% dos clones amplificados, novamente confirmando que o clone 2 é orientado, pois não apresentou a banda de 611bp e também confirmou a inversão no clone 1.

A próxima etapa para a obtenção do nosso vetor de interesse pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen é a clonagem do gene repórter ZsGreen no segundo sítio de clonagem downstream ao promotor pTRE. Esse sítio de clonagem é localizado logo após a sequência IRES (Internal Ribosome Entry Site) e fará que um único mRNA transcrito resulte na tradução de duas diferentes proteínas.

Para isso o vetor de clonagem TOPO2.1 contendo o gene ZsGreen foi digerido com a enzima PstI para isolamento do fragmento, e a mesma enzima foi utilizada para linearizar o vetor pTRE-Cx43-IRES. Fizemos uma reação de ligação contendo o fragmento ZsGreen e o vetor pTRE-Cx43-IRES linearizado segundo o protocolo descrito no item 4.1.4.

Assim como na clonagem do inserto Cx43, obtivemos uma baixa eficiência no número de clones positivos para a inserção do gene ZsGreen. Para isso repetimos o experimento de screening de colônias utilizando primers de detecção do gene repórter e das 50 colônias analisadas 3 foram positivas. Mais uma vez atribuímos essa baixa eficiência à escolha de uma única enzima flanqueadora para clonagem. A verificação da orientação da inserção foi confirmada pela técnica de sequenciamento, servindo também para saber se o gene inserido estava no mesmo frame que o IRES (figura 62).

Esses clones positivos foram sequenciados em quintuplicatas e os dados analisados em softwares de bioinformática para remover qualquer erro na leitura da técnica. Observamos que dos três clones, apenas um deles estava na orientação desejada. Também verificamos que o start códon do gene ZsGreen estava no mesmo frame de códons que o ATG interno do IRES, gerando a ORF (Open Reading Frame) correta. Isso é de fundamental importância, pois a tradução iniciava-se nesse ATG do IRES, e caso o start códon estivesse em outro frame de códons, a proteína originada seria diferente da esperada.

Partindo desses resultados, consideramos o vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen pronto, contendo todas os insertos orientados e com todos os componentes necessários para a expressão nos genes de interesse. O correto funcionamento do sistema induzido por doxíciclina ainda deve ser analisado *in vitro* para só então passarmos para os experimentos *in vivo*.

Figura 62- Figura ilustrativa da análise dos contigs obtidas pela técnica de sequenciamento. Dos três clones positivos para o gene ZsGreen, apenas um deles apresentou a inserção orientada e em frame com o ATG inicial presente na região IRES.

5.3 Validação do sistema Cx43Tet *in vitro*.

Após a verificação da correta expressão do gene rTetR pelo vetor pCx43-Tet3G, precisávamos confirmar o correto funcionamento do sistema completo, composto pelo vetor pCx43-Tet3G e o vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen. Para isso realizamos testes *in vitro* utilizando novamente células HeLa e E10 transfectadas com ambos os vetores e a expressão gênica estimulada pelo fármaco doxíciclina.

Desde o início do trabalho sabíamos que seria importante diferenciar a proteína Cx43 recombinante da proteína Cx43 endógena do animal, e como elas são 100% homólogas, e com a mesma constituição de aminoácidos, decidimos adicionar à proteína recombinante um *tag* de aminoácidos. Para isso escolhemos o *tag* correspondente ao epítopo viral V5, que corresponde a um resíduo de 14 aminoácidos na porção carboxi-terminal da proteína Cx43 recombinante e não terá função biológica. Essa região foi fundamental para realizarmos as técnicas de biologia molecular, tanto para imunodeteção, quanto amplificação por PCR.

O primeiro estudo que realizamos foi para avaliar os níveis de mRNA produzidos pelos genes de interesse. Seguindo a mesma ideia dos testes *in vitro* do vetor pCx43-Tet3G descritos no item 5.1.3 utilizamos as duas linhagens celulares, sendo as células HeLa como controle negativo de expressão para Cx43 e as células E10 como controle positivo. Utilizamos novamente o vetor pCMV-Tet3G como controle positivo de expressão de rTetR, mas dessa vez associado com o vetor a ser validado, o pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen.

Avaliamos a expressão dos quatro genes envolvidos no sistema de expressão Cx43Tet, sendo eles a proteína ativadora rTetR, Cx43 total, Cx43 recombinante e o gene repórter ZsGreen. Sendo que ainda utilizamos um gene como controle endógeno da reação, o RNA ribossomal 18S. Avaliamos também a variação da expressão desses genes quando submetidos à diferentes doses de doxíciclina (0, 100 e 1000ng/uL). Todos os dados de expressão foram normalizados utilizando a expressão de rTetR na dose 0ng/uL.

Pela análise dos gráficos da figura 63, observamos em ambas as linhagens, que os níveis de expressão do gene rTetR não varia conforme a dose de doxíciclina.

Esse resultado é perfeitamente esperado, pois o promotor de expressão desse gene é o pCMV (HeLa) ou pCx43 (E10) e nenhum deles sensível ao tratamento de doxíciclina. Outro resultado também já esperado era que nas células HeLa sem doxíciclina não houvesse expressão de Cx43. Também na ausência de doxíciclina, as células E10 apresentaram expressão de Cx43 praticamente no mesmo nível de expressão do gene rTetR. Esses dados corroboram com a nossa previsão, pois ambos os genes são modulados pelo mesmo promotor pCx43, dessa forma recebem o mesmo estímulo de expressão celular.

Quando estimulamos a expressão gênica por doxíciclina, ambas as linhagens apresentaram expressão do gene Cx43 recombinante e do gene repórter ZsGreen. Os níveis de Cx43 recombinante que encontramos nessas células estavam ligeiramente abaixo dos níveis de expressão do Cx43 total, já que os primers que desenhamos para Cx43 total também possuem homologia pela sequência Cx43 recombinante, e dessa forma o amplificando também.

Figura 63- Gráficos resultantes da análise de expressão gênica pela técnica de Real Time PCR em células transfectadas com o sistema Cx43Tet, e com diferentes doses de doxíciclina. Utilizamos o gene 18S como controle endógeno da reação e todos os dados de expressão foram normalizados utilizando a expressão de rTetR na dose 0ng/uL. (A) Expressão dos genes de interesse que compõe o sistema Cx43Tet em células HeLa. (B) Expressão dos genes de interesse que compõe o sistema Cx43Tet em células E10.

A próxima etapa na validação do sistema foi fazer o estudo das proteínas que compõem o sistema de expressão. Primeiramente realizamos as análises de detecção das proteínas in situ pela técnica de imunofluorescência. Para isso as células HeLa foram transfectadas com o conjunto de vetores pCMV-Tet3G e pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen, e as células E10 com o vetores pCx43-Tet3G e pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen e tratadas por 3 dias com 100ng/uL de doxíciclina.

Assim como descrito no item 4.2.4, as células foram marcadas com anticorpos primários para cada proteína alvo, e revelados com anticorpo conjugado. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 64 e figura 65.

Figura 64- Fotomicrografias em microscopia confocal para estudo da localização das proteínas de interesse, expressas pelo sistema Cx43Tet; estudo *in vitro* em células HeLa e E10. (A-B) Proteínas rTetR marcadas em verde (FITC); (C-D) Proteínas Cx43 recombinantes marcadas com TRITC (vermelho); (E-F) Proteínas Cx43 marcadas com TRITC (vermelho). Núcleos marcados com DAPI (azul) Barra de escala: 5μm

Observamos por meio da técnica de imunofluorescência que o sistema de expressão Cx43Tet esta funcionando perfeitamente. Algumas das nossas preocupações iniciais foram sanadas depois desses resultados, pois a nossa proteína de interesse Cx43 é uma proteína de membrana e essa migração é dependente de sinalizadores celulares, inclusive alguns presentes na própria proteína. Os primeiros aminoácidos da proteína formam um complexo denominado peptídeo sinal que carrega informações pós traducionais, e no caso da Cx43 informações para migração para a membrana.

Novamente detectamos o correto funcionamento da expressão do gene rTetR tanto nas células HeLa (figura 64A), quanto nas células E10 (figura 64B). Conseguimos detectar em ambas as linhagens, por meio do anticorpo anti-V5, as proteínas Cx43 recombinantes, observamos marcações positivas (vermelho) de proteínas presentes na membrana e também no citoplasma (figura 64C-D). Conseguimos detectar nas células HeLa a presença de Cx43 por meio do anticorpo monoclonal anti-Cx43, isso nos indica que a proteína recombinante que está sendo traduzida mantém a mesma estrutura de epítomos da Cx43 endógena (figura 64E).

As proteínas do gene repórter ZsGreen também foram detectadas pela técnica de imunofluorescência utilizando o anticorpo primário anti-ZsGreen. Conseguimos observar um fraco sinal fluorescente nas células vivas na cultura, mas após a fixação essa fluorescência desaparecia, apenas sendo detectada pela utilização de anticorpos. A figura 65 ilustra a proteína ZsGreen (verde) na região citoplasmática e no complexo de Golgi de ambas as linhagens.

Figura 65- Fotomicrografias em microscopia confocal para estudo da localização da proteína repórter ZsGreen expressa pelo sistema Cx43Tet; estudo *in vitro* em células HeLa e E10. (A) Proteína ZsGreen expressas pelas células HeLa marcadas com FITC (verde). (B) Proteína ZsGreen expressas pelas células E10 marcadas com FITC (verde). Núcleos marcados com DAPI (azul). Citoesqueleto (actina) marcado com falotoxina (vermelho).

A última etapa da validação do sistema foi feita pela quantificação absoluta das proteínas rTetR e Cx43 recombinante por meio da técnica de Western blot. Para isso, assim como no experimento de expressão gênica, utilizamos diferentes doses de doxíciclina para estimular diferentes níveis de expressão do gene Cx43 recombinante. As células da linhagem HeLa e E10 transfectadas com os vetores do sistema Cx43Tet foram estimuladas por três diferentes doses de doxíciclina (0, 10 e 1000ng/uL) e após três dias de cultivo, mensuramos a quantidade de proteínas produzidas pelo sistema celular.

Novamente fomos capazes de detectar a proteína ativadora rTetR em ambas as linhagens, sendo que nas células HeLa a expressão foi dirigida pelo promotor pCMV e nas células E10 pelo promotor pCx43, além disso os níveis da proteína não foram alterados com o aumento da dose de doxíciclina (figura 66A). A expressão da Cx43 recombinante, assim como esperado, foi ausente nas células que não receberam doxíciclina, indicando a não ativação do gene (figura 66B).

Quando fornecemos a doxíciclina, conseguimos detectar a presença da proteína Cx43 recombinante, e os níveis de detecção possuem relação direta com a

dose do fármaco. Na dose de 10ng/uL foi possível detectar uma discreta banda em ambas as linhagens, enquanto na dose de 1000ng/uL a banda foi muito mais intensa. Além disso, na dose mais concentrada de doxiciclina observamos duas bandas próximas, que provavelmente refere-se à níveis de fosforilação diferentes das conexinas. Isso indica mais uma vez o correto processamento pós-traducional sofrido pela a nossa proteína recombinante (figura 66B).

Figura 66- Fotografia das membranas resultantes da técnica de Western blot que foram submetidas aos anticorpos anti-rTetR (A) e anti-V5 (B) e reveladas pelo sistema quimioluminiscente ECL-Plus. Para cada uma das linhagens transfectamos os vetores relacionados na figura, bem como cada uma das doses também ilustradas.

Após todos esses resultados da validação do sistema Cx43Tet foi possível perceber o sucesso *in vitro* na expressão de todos os genes de interesse. Por meio do estudo no mRNA percebemos que o sistema de expressão permanece desligado na ausência de doxiciclina e que uma baixa quantidade (10ng/uL) já é suficiente para iniciar a transcrição. Os resultados obtidos pela análise das proteínas corroboram com os do mRNA, ficando evidente a detecção das proteínas *in situ* pela técnica de imunofluorescência e também no Western blot.

Além de apresentar transcritos, as proteínas originadas pela tradução aparentemente são funcionais. Não realizamos nenhum estudo de comunicação

celular, porém a proteína Cx43 recombinante foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-Cx43, indicando a similaridade de epítomos, e assim provavelmente possui a mesma estrutura da Cx43 original. Ainda detectamos a nossa proteína recombinante de interesse localizada na membrana, indicando o correto processamento pós-traducional e conservação do peptídeo sinal. Sendo assim, consideramos o sistema pronto para ser transferido para os zigotos e obtenção dos animais geneticamente modificados.

5.4 Quantidade e qualidade dos zigotos obtidos

O primeiro passo para iniciar os experimentos de transferência dos vetores para os zigotos, foi justamente a obtenção destes. No início dos experimentos as fêmeas B6CBAF1 não responderam bem ao tratamento de superovulação, nesses casos obtivemos poucos zigotos de cada uma das doadoras, sendo que grande parte deles estavam degenerados ou não fertilizados.

Após repetição do protocolo suspeitamos que fosse algum problema nutricional que estivesse afetando a quantidade e qualidade dos zigotos obtidos, e para isso suplementamos os animais, tanto fêmeas, quanto os machos, com sementes oleaginosas, como grãos de milho e sementes de girassol. As sementes foram autoclavadas e depois oferecidas *ad libitum* para os animais.

Percebemos uma melhora significativa no aumento do número de zigotos e principalmente na qualidade deles. Notamos uma redução na proporção de células inviáveis em relação às viáveis, e isso foi fundamental para a continuação da técnica. A melhora na qualidade dos zigotos facilitou a técnica de microinjeção pronuclear.

A figura 67 ilustra exatamente esses dados, o número absoluto de zigotos obtidos em cada fêmea superovulada, sendo que as seis primeiras fêmeas fizeram parte dos dois grupos de superovulação sem suplementação com sementes, e as fêmeas seguinte, todas receberam a suplementação.

Figura 67- Gráfico ilustrativo do número de zigotos obtidos em cada uma das fêmeas, com a discriminação dos zigotos classificados como viáveis ou inviáveis. A classificação é dada pela morfologia dos zigotos, incluindo zigotos que não estejam fertilizados, com divisão celular, número extra de corpúsculos polares e aumento exacerbado da região perivitelínica.

5.5 Taxa de nascimento dos animais resultante da técnica de transferência de embrião.

Os zigotos que foram considerados viáveis no item 5.4 foram separados e cultivados conforme descrito no item 4.3.3 até o momento da micromanipulação. Devido à fragilidade dessas células, evitamos longos períodos de cultivo *in vitro*, mas durante a execução da técnica percebemos que logo após a obtenção, os zigotos ainda não estavam no melhor estágio para realização da microinjeção pronuclear. Observamos que após uma hora em cultivo *in vitro* os zigotos apresentavam pronúcleos mais bem definidos, o que facilitou o processo de microinjeção.

A partir do processo de obtenção dos zigotos todos os estágios são críticos para o sucesso na transgênese. São protocolos que demandam muito treino por parte do manipulador e habilidades manuais, tanto para controle do micromanipulador, quanto para a microcirurgia de transferência de embrião para a fêmea receptora. Para avaliar a qualidade da nossa manipulação, medimos a taxa

de nascimento de animais que foram derivados de embriões manipulados e transferidos para as fêmeas receptoras.

Em cada experimento manipulávamos por volta de 40 zigotos provenientes de duas ou três fêmeas doadoras. Essas células sofreram a microinjeção pronuclear como descrito no item 4.3.4 e cultivadas novamente por mais uma hora até o momento da cirurgia de transferência, descrito no item 4.3.5. Nesse período pós-manipulação, alguns zigotos invariavelmente entravam em processo de morte celular devido problemas na técnica. Esses embriões mortos eram separados e não transferidos.

Para cada infundíbulo da fêmea transferimos não mais que 20 embriões, pois trabalhos mostram que isso diminui a eficiência da técnica, reduzindo o número de animais nascidos. Também não transferimos menos que 10 animais para cada receptora, pois é fundamental um número mínimo de fetos para a manutenção hormonal do corpo lúteo num primeiro momento, e posteriormente a manutenção da gestação.

Nos 18 experimentos realizados transferimos 424 embriões, sendo que obtivemos 102 nascimentos, representando uma taxa de 24% de sucesso. Obtivemos de 2 à 10 animais nascidos por receptora, indicando uma média de 5,6 filhotes por fêmea. Os resultados obtidos foram plotados num gráfico que está ilustrado na figura 68, indicando o número total de embriões transferidos, animais nascidos e a taxa de nascimento, expressa em porcentagem, de cada experimento.

Percebe-se pelos dados que nos primeiros experimentos a taxa de nascimento foi baixa, cerca de 15%, inclusive o primeiro experimento não resultou em nascimentos. Atribuímos esse resultado à falta de prática, tanto na microinjeção pronuclear, quanto na cirurgia de transferência de embrião, tanto que com a passagem dos experimentos a taxa de nascimento aumentou, alcançando uma taxa de 31% de nascimentos na segunda metade.

Figura 68- Gráfico ilustrativo do número de animais nascidos em relação ao número de embriões transferidos em cada um dos experimentos. A taxa de nascimento depende de vários fatores, desde a manipulação dos embriões, técnicas de cultivo até o processo de microinjeção pronuclear. Nos primeiros experimentos fica evidente o baixo nível de sucesso que atribuímos à falta de prática, mas essa situação mudou a partir da segunda metade dos experimentos, onde, em média, dobramos a taxa de nascimento.

5.6 Identificação dos animais geneticamente modificados

Os nascimentos dos animais foram distribuídos ao longo de quase seis meses de experimentos, e conforme ocorreram, o DNA genômico dos animais foram avaliados em busca do genótipo de interesse, ou seja, buscávamos animais que albergavam os vetores integrados ao seu genoma.

Conforme descrito no item 4.3.6 realizamos a identificação do genótipo dos animais por meio da técnica de PCR utilizando primers específicos para cada um dos vetores. Conforme ilustrado na figura 69A, o genótipo positivo para o vetor pCx43-Tet3G deveria apresentar duas bandas, de 1.100bp e 450bp enquanto os positivos para o vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen apresentariam bandas de 900bp e

460bp. Na figura 69C-D estão ilustrados o mapa dos vetores contendo a região de ligação de cada um dos primers.

Dos 271 zigotos que receberam o vetor pCx43-Tet3G, obtivemos 57 nascimentos e nenhum transgênico; dos 153 zigotos que receberam o vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen, conseguimos 45 nascimentos, mas novamente nenhum transgênico (figura 69B). Todos os genótipos foram repetidos e os devidos controles da reação foram realizados, excluindo assim problemas na técnica de genotipagem.

Trabalhos relatam que a eficiência da técnica de transgênese por microinjeção pronuclear é de cerca de 3%, podendo chegar até 7% em laboratórios renomados. Baseando-se nesses dados esperávamos obter ao menos um animal geneticamente modificado entre os nascidos. Fatores críticos como o cultivo dos embriões, microinjeção pronuclear e a cirurgia de transferência são os mais descritos como causas do insucesso na obtenção de transgênicos, porém nossos índices de nascimento de animais derivados da manipulação estão de acordo com os descritos na literatura.

Outro ponto crítico que também é relatado como causa comum do insucesso é a qualidade do DNA transferido aos zigotos. Essa é, possivelmente, a nossa causa, pois não foi possível realizar controle dessa qualidade antes da microinjeção. Nós seguimos os protocolos mais utilizados em grandes laboratórios para a purificação do DNA, incluindo os melhores kits de purificação disponíveis no mercado. Por algum motivo incompreendido o DNA por nós transferido ao zigoto não se integrou ao DNA genômico e não foi detectado na técnica de genotipagem.

Outra possível causa, mas na nossa opinião menos provável, é a letalidade do embrião causada pela expressão do DNA exógenos, causando assim a morte intrauterina desses animais que albergavam o nosso transgene. Consideramos menos provável essa causa, pois tivemos problemas em ambos os vetores, que são constituídos de genes diferentes. Ainda considerando a possibilidade de letalidade embrionária, a solução de diluição do DNA é outro ponto crítico, porém utilizamos um protocolo amplamente utilizado, além disso, obtivemos uma taxa de nascimento satisfatória, o que em caso de toxicidade da solução seria reduzida.

Figura 69- Resultados obtidos das genotipagens dos animais nascidos. (A) Fotografia do gel de agarose 1,2% resultante do padrão esperado dos animais positivos A1 animais pCx43Tet3G e A2 animais pTRE-Cx43-IRES_ZsGreen. (B) Gráfico ilustrativos da relação de animais transferidos e nascidos de cada um dos vetores microinjetados. (C) Mapa do vetor pCx43Tet3G com as regiões amplificadas. (D) Mapa do vetor pTRE-Cx43-IRES-ZsGreen com as regiões amplificadas

6 DISCUSSÃO

A transgênese animal é uma das maiores evoluções da ciência dos últimos anos, sendo que causou uma revolução nos métodos de pesquisa envolvendo animais, pois aumentou a qualidade dos experimentos e facilitou a metodologia dessas pesquisas. Esses modelos animais proporcionaram que pesquisadores refinassem seus experimentos devido à possibilidade de trabalhar com variações em um único gene, um único fenótipo, uma única variável. Além disso, a transgênese animal tem permitido estudar *in vivo* o papel de genes, ou da falta de sua expressão, em processos fisiológicos e patológicos.

Infelizmente para muitos dos genes de interesse o estudo torna-se mais complexo devido dificuldades na criação dos modelos geneticamente modificados, estima-se que um terço dos genes quando inativados resulta em letalidade ainda na fase embrionária ou fetal (Gama-Sousa, 2010). Algumas alternativas já foram obtidas nesse intuito, como os animais knockouts condicionais que possuem o gene inativo em apenas alguns tipos celulares ou tecido, mas ainda não possuímos uma estratégia de transgênese que possibilite a inativação desses genes críticos em todo o genoma, sem causar a letalidade precoce.

O objetivo desse trabalho foi procurar uma alternativa para estudar o papel da Conexina 43 em processos fisiológicos e patológicos, num sistema que permitisse abolir completamente a expressão gênica e a produção de proteínas. Até o presente, não dispúnhamos de modelo adequado com estas características, pois o modelo animal disponível, criado por Reaume et al, 1995, permite apenas avaliar camundongos heterozigotos para a Cx43, já que animais Cx43^{-/-} morrem devido malformações cardíacas logo após o nascimento, tornando assim esse modelo inviável para estudos (Reaume, 1995).

Nossa estratégia foi reintroduzir o gene Cx43 em linhagens knockouts para esse mesmo gene, porém esse novo transgene possuiria expressão controlada por meio do estímulo farmacológico da doxíciclina.

Dentre os diversos tipos de expressão induzida escolhemos o sistema Tet-On (Clontech®) que se baseia no sistema de resistência genético de bactérias *E. coli* resistentes à tetraciclina (Gossen, 1992). A decisão por esse sistema é o fato de ser

o mais recentemente criado, possuindo baixo efeito residual de expressão do gene de interesse e também que apresenta grande sensibilidade da droga em baixas doses (Berens, 2003).

Os vetores por nós adquiridos fazem parte do sistema bicistrônico de expressão que é um sistema de dois genes regulados por um único promotor, que nesse caso é o pTRE induzível. Esse sistema foi escolhido pela necessidade de trabalhos futuros precisarem de um gene repórter para caracterizar algum parâmetro relacionado com a expressão do gene de interesse Cx43, e para isso escolhemos associar a esse gene, o repórter fluorescente ZsGreen.

A construção dos vetores plasmidiais, conforme descrito nos resultados, obteve êxito nas condições previstas.

Após conseguirmos superar a primeira etapa de construção dos vetores de transgênese, foi necessário validarmos o seu funcionamento *in vitro*. Essa etapa é de extrema importância, pois até esse momento, toda a estratégia havia sido planejada de forma empírica, baseando-se em idéias originais, e utilizando-se bioinformática para auxiliar na construção. Portanto esta etapa foi de fundamental importância antes de partirmos para experimentos *in vivo*. Este foi o primeiro momento em que testamos nossas construções em um sistema biológico.

Nesse trabalho escolhemos duas linhagens celulares distintas para serem utilizadas como sistema biológico de expressão. A primeira linhagem utilizada foi a de células HeLa, pois é uma linhagem humana sabidamente negativa para a expressão de Cx43, servindo assim como controle negativo de expressão, ou seja, se a nossa idéia e estratégia estivessem corretas, o nosso sistema de expressão não funcionaria nessa linhagem, pois a célula não ativaria o promotor pCx43, que por sua vez não transcreveria a proteína rTetR necessária para transcrição do nosso gene de interesse, mostrando assim a seletividade de expressão desejada por nós.

A segunda linhagem escolhida foi a E10, cujas células são murinas, provenientes de epitélio pulmonar, não tumorais e imortalizadas, que sabidamente expressam o gene Cx43. Essas células foram utilizadas como controles positivos de expressão, pois possuem os fatores transcripcionais para estimular o pCx43,

produzindo assim a proteína rTetR, que na presença de doxíciclina ativará a expressão do gene de interesse Cx43 e sua proteína associada, o repórter ZsGreen.

Os resultados das análises dessas células trasfectadas nos mostraram que nossas construções estavam com a correta funcionalidade, e de acordo com a nossa estratégia. Nós possuíamos dúvidas quanto à sequência utilizada como pCx43, pois poucos trabalhos descreviam a sequência e regiões adequadas para expressões heterólogas, mas os resultados obtidos nas células HeLa nos mostraram que apesar de todas essas dúvidas, a sequência utilizada manteve a seletividade de expressão. Esse resultado associado com a expressão positiva nas células E10 nos deu certeza do sucesso da estratégia.

Por meio das técnicas de biologia molecular foi possível traçar em todas as etapas o perfil da expressão do nosso sistema. Utilizando a técnica de Real Time PCR detectamos a presença de mRNA de todos os genes relacionados com o sistema de expressão. Percebemos também a dependência da dose de doxíciclina administrada em função da expressão, sendo que quanto maior a dose, maior o nível de expressão da Cx43 recombinante e do gene repórter. O gene ativador rTetR não apresentou alterações em relação às doses. Esses resultados corroboraram com os obtidos pela técnica de Western blotting, pois da mesma forma detectamos as proteínas de interesse.

Um dado interessante que observamos é o fato de que na ausência de doxíciclina o gene não possui atividade. Alguns trabalhos (Berens, 2003, Loew, 2010), inclusive a literatura oficial da empresa Clontech® relatam efeitos residuais de expressão mesmo na ausência, porém em nossas análises não detectamos nem mRNA, nem proteína nos tratamentos sem doxíciclina,. Essa característica é a ideal, pois o nosso intuito sempre foi poder regular a expressão nos animais transgênicos, e o fato da expressão ser ausente sem a droga é animadora.

Outra incerteza que possuíamos no início da estratégia era se a nossa proteína recombinante teria a capacidade de ser processada pela célula e enviada para a membrana plasmática, onde teria a função natural. Essa capacidade é armazenada na região N-terminal da proteína conhecida como peptídio sinal. Nossa preocupação era que qualquer alteração nessa região inicial inviabilizasse toda a nossa estratégia. Entretanto, por meio da técnica de imunofluorescência

percebemos que a proteína recombinante estava presente na membrana. Não fizemos testes adicionais de funcionalidade dos canais devido a complexidade do experimento e falta de instrumentos para medir a condutância elétrica das células mediada pelos canais das junções gap.

Após todos esses resultados positivos e confirmação do sucesso da construção dos nossos vetores, sentimo-nos seguros para passarmos para o outro passo, transferir esses vetores para zigotos e obter os animais geneticamente modificados, nosso objetivo maior desse trabalho.

A técnica de transgênese, como já ilustrado anteriormente na revisão da literatura, é um conjunto de etapas que ao primeiro olhar aparenta ser simples, porém são técnicas experimentalmente difíceis, com muitos detalhes, e o maior dos agravantes: demanda por parte do pesquisador muita habilidade manual. Essa técnica compreende desde a ideia inicial e primeiros trabalhos na bioinformática, até a manipulação de embriões e genotipagem dos animais nascidos.

Desde o início da estratégia optamos fazer a entrega dos vetores por meio da microinjeção pronuclear devido ser a mais utilizada na literatura e também por possuir um rendimento de transgênicos satisfatório (Wall, 2001). De todas as técnicas de entrega em zigotos, essa é a mais complexa de todas, pois é necessária prática manual e calma no sistema de micromanipulação e também aptidão visual para identificação dos pronúcleos.

Inicialmente tivemos alguns problemas, como já descritos nos resultados, quanto à qualidade dos embriões. Inicialmente atribuímos essas anormalidades a problemas hormonais do protocolo de superovulação, porém posteriormente descobrimos que eram problemas nutricionais. A qualidade dos embriões, e consequentemente a qualidade da manipulação e taxas de nascimentos aumentaram significativamente quando introduzimos sementes oleaginosas na dieta dos reprodutores.

Esse modelo transgênico foi o primeiro proposto por nossa equipe, que apesar de ter experiência prática no assunto enfrentou o desafio de criar estrutura e padronizar os experimentos à realidade do nosso laboratório.

Inicialmente enfrentamos diversas situações adversas e praticamente todos os obstáculos foram superados, até conseguirmos uma taxa de prenhez e de nascimentos satisfatória ao longo dos experimentos. Esses problemas iniciais relacionavam-se principalmente à prática de manipulação e estabelecimento dos parâmetros de cultivo dos embriões. Ao final dos experimentos obtivemos uma média de 31% de nascimentos em relação ao número de zigotos microinjetados. Apesar de ser uma taxa baixa comparada com laboratórios de referência em outros países, consideramos esta taxa adequada à nossa realidade. Centros de pesquisa que conhecemos durante esse projeto possuem taxas de sucesso muito mais altas, tais como National Institute of Health (NIH – Washington - USA) 70%, European Molecular Biology Laboratory (EMBL – Monterotondo – Itália) 80%, Alexander Fleming Biomedical Science Research Center (Atenas – Grécia), 75%, porém possui uma equipe de técnicos, maior estrutura e tradição de muitos anos de aperfeiçoamento.

Durante esse projeto realizamos cerca de 20 experimentos que resultaram em mais de 300 embriões, sendo pouco mais de 100 nascidos. Dentre os animais nascidos, nenhum deles apresentou o genótipo transgênico para algum dos dois vetores. Esse resultado foi inesperado por nós, que apesar de conscientes das limitações técnicas e estruturais, esperávamos conseguir ao menos um animal para ser analisado e tornar-se fundador da colônia de transgênicos.

Trabalhos relatam que a eficiência da técnica de transgênese por microinjeção pronuclear é de cerca de 3%, podendo chegar até 7% em laboratórios renomados. Fatores críticos como o cultivo dos embriões, microinjeção pronuclear e a cirurgia de transferência são os mais descritos como causas do insucesso na obtenção de transgênicos. Apesar disso, os índices de nascimento de animais derivados da manipulação em nossos experimentos estão de acordo com os descritos na literatura (Moisyadi, 2008; Moreira, 2007; Wall, 2000; Wall, 2001)

Outro ponto crítico que também é relatado como causa comum do insucesso é a qualidade do DNA transferido aos zigotos. Em nossos experimentos, não foi possível realizar controle da qualidade do DNA antes da microinjeção nos zigotos, apesar de termos seguido os protocolos mais utilizados em grandes laboratórios para a purificação do DNA, incluindo os melhores kits de purificação disponíveis no

mercado. Por algum motivo incompreendido, o DNA por nós transferido ao zigoto não se integrou ao DNA genômico e não foi detectado pelas reações de PCR para a genotipagem. A falta de controle de qualidade do DNA pode ter contribuído para o insucesso da eficiência das microinjeções e integração dos transgenes ao genoma do camundongo.

Outro fator que poderia ter sido responsável pelo insucesso na obtenção dos animais transgênicos idealizados por nós seria a letalidade do embrião causada pela expressão do DNA exógenos, causando assim a morte intrauterina do animais que albergavam o nosso transgene. Consideramos menos provável essa causa, pois tivemos problemas em ambos os vetores, que são constituídos de genes diferentes. Ainda considerando a possibilidade de letalidade embrionária, a solução de diluição do DNA é outro ponto crítico, porém utilizamos um protocolo amplamente utilizado, além disso, obtivemos uma taxa de nascimento satisfatória, o que em caso de toxicidade da solução seria reduzida.

Outros fatores que poderiam ter contribuído para o insucesso na obtenção dos animais transgênicos são alheios à nossa vontade, e consistem, por exemplo, de problemas relacionados à morosidade da importação de reagentes em nosso País, e a preservação da qualidade dos reagentes que chegam até nossos laboratórios.

Apesar de até esse momento não termos obtido nenhum animal transgênico dentre os nascidos, já estamos considerando possíveis alternativas para obter esse animal tão almejado por nosso grupo.

Estamos preparando protocolos alternativos de purificação de DNA baseado em Cho et al. (2009), em que os autores propõem uma purificação baseada na diálise dos vetores para eliminação de impurezas e posterior concentração do vetor. Outro item que estamos discutindo em modificar, em relação ao protocolo até agora utilizado, é quanto ao método de entrega do vetor. Durante visita a um grande centro de transgênese europeu (EMBL – Monterotondo – Itália) aprendemos a técnica de ICSI (descrever o que é ICSI), e uma das grandes vantagens dessa técnica é o alto rendimento de transgênicos, podendo ultrapassar 20% de sucesso (Moreira, 2009).

Finalizando, nosso estudo demonstrou que é possível elaborar um sistema de expressão induzida (condiciona) da conexina 43, que permitira, por ora, estudar o papel desta conexina in vitro. Certamente ganhamos experiência no desenvolvimento de técnicas de transfecção in vitro, além de termos adquirido conhecimentos teóricos e práticos para a obtenção de animais geneticamente modificados, tão úteis na pesquisa biomédica.

Apesar dessa tese ter chegado ao fim, esse trabalho continua, e, esperamos, em breve noticiar o nascimento desse importante modelo, que será fundamental para o aprofundamento dos estudos das junções comunicantes do tipo gap. Acreditamos na nossa ideia.

7 CONCLUSÕES

Foi criado por meio de técnicas de biologia molecular um sistema de expressão condicional do gene *Conexina 43* utilizando o sistema de expressão induzida por tetraciclina Tet-On.

Após estudos *in vitro* utilizando células HeLa e E10 este sistema mostrou-se eficiente, tendo expressado condicionalmente a *Conexina 43*, além de verificarmos a especificidade celular do sistema de promoção, a alta sensibilidade da indução em tratamentos com 10ng/mL de doxíciclina, a ausência de expressão em tratamentos sem doxíciclina, e também a presença da nossa proteína de interesse na membrana plasmática.

Não foi possível, nas condições deste estudo, obter a expressão do sistema induzível *in vivo*.

REFERÊNCIAS*

- Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 2001;233:258–70.
- Alberts B. DNA Replication Repair and Recombination. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York; 2002.
- Ale-Agha N, Galban S, Sobieroy C, Abdelmohsen K, Gorospe M, Sies H, Klotz LO. HuR regulates gap junctional intercellular communication by controlling beta-catenin levels and adherens junction integrity. *Hepatology.* 2009;50:1567–76.
- Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, Mackowiak II, Mori CM, da Silva TC, Oloris SC, Gárate AP, Massironi SM, Yamasaki H, Dagli ML. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis.* 2004;25(10):1973-2
- Avshalumova L, Fabrikant J, Koriakos A. Overview of skin diseases linked to connexin gene mutations. *Int J Dermatol.* 2013;15
- Bajpai S, Shukla VK, Tripathi K, Srikrishna S, Singh RK. Targeting connexin 43 in diabetic wound healing: future perspectives. *J Postgrad Med.* 2009; 55(2):143-9.
- Balbo PB, Bohm A. Mechanism of Poly(A) Polymerase: Structure of the Enzyme-MgATP-RNA Ternary Complex and Kinetic Analysis. *Structure.* 2007;15(9):1117–31.
- Batias C, Defamie N, Lablack A, Thepot D, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 1999;298:113-21.
- Belizario JE, Akamini P, Strauss PWB, Xavier-Neto J. New routes for transgenesis of the mouse. *J Appl Genetics.* 2012;53:295–15.
- Bennet MVL, Barriolc-Bargiello Ta, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC. Gap junctions: new tools new answers new questions. *Neuron.* 1991;6:305-20.
- Berens C, Hillen W. Gene regulation by tetracyclines Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem.* 2003;270(15):3109-21.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Berthoud VM, Montegna EA, Atal N, Aithal NH, Brink PR, Beyer EC. Heteromeric connexons formed by lens connexin Cx43 and Cx56. *Eur J Cell Biol.* 1990;80:11-19.
- Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, Harris AL. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273:2808–16.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to gap junction protein from liver. *J Cell Biol.* 1987;195:2621-29.
- Bier A, Oviedo-Landaverde I, Zhao J, Mamane Y, Kandouz M, Batist G. Connexin43 pseudogene in breast cancer cells offers a novel therapeutic target. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:786–93.
- Bloor DJ, Wilson Y, Kibschull M, Traub O, Leese HJ, Winterhager E, Kimber SJ. Expression of connexins in human preimplantation embryos in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2004;2:25-30.
- Brackett BG. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ovathrough fertilization. *PNAS.* 1971;68(2):353–57.
- Brader P, Serganova I, Blasberg RG. Noninvasive molecular imaging using reporter genes. *J Nucl Med.* 2013;54(2):167-72.
- Brand-Schieber E, Werner P, Iacobas DA, Iacobas S, Beelitz M, Lowery SL, Spray DC, Scemes E. Connexin43 the major gap junction protein of astrocytes is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2005;80(6):798-08.
- Buniello A, Montanaro D, Volinia AA, Gasparini P, Marigoa V. An expression atlas of connexin genes in the mouse. *Genomics.* 2004;83: 812–20.
- Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1989;5:70–6.
- Cartwright EJ. *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols.* Terceira edição. Editora Springer. 2009.
- Catt JW, Rhodes SL. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(2):161-6.
- Chaible LM, Corat MA, Abdelhay E, Dagli ML. Genetically modified animals for use in research and biotechnology. *Genet Mol Res.* 2010;279:1469-82.
- Chaible LM, Kinoshita D, Corat MAF, Dagli MLZ. Animal models for the study of human disease. New York: Elsevier; 2013. Chapter 33.
- Champlin AK, Dorr DL, Gates AH. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod.* 1973;8(4):491-4.

- Chen KH, Wu CH, Tseng CC, Shiau JM, Lee CT, Lin CR. Intrathecal coelectrotransfer of a tetracycline-inducible three-plasmid-based system to achieve tightly regulated antinociceptive gene therapy for mononeuropathic rats. *J Gene Med*. 2008;10(2):208-16.
- Cheng LT, Sun LT, Tada T. Genome editing in induced pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 2012;17(6):431-8.
- Choi T, Huang M, Gorman C, Jaenisch R. A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1991;11(6):3070.
- Clark AJ, Archibald AL, McClenaghan M, Simons JP, Wallace R, Whitelaw CB, Enhancing the efficiency of transgene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1993;339:225-32.
- CONN PM. Animal models for the study of human disease. New York: Elsevier. 2013.
- Cox BC, Liu Z, Lagarde MM, Zuo J. Conditional gene expression in the mouse inner ear using Cre-loxP. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2012;13(3):295-22.
- Dagli MIZ, Yamasaki H, Krutovskikh V, Omori Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. *Carcinogenesis*. 2004;25:483-92.
- Damsky C, Sutherland A, Fisher S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis implantation and placentation. *FASEB J*. 1993;14:1320-9.
- Davies TC, Barr KJ, Jones DH, Zhu D, Kidder GM. Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev Genet*. 1996;18:234-43.
- De Sousa PA, Valdimarsson G, Nicholson BJ, Kidder GM. Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development*. 1993;117:1355-67.
- Decrouy X, Gasc JM, Pointis G, Segretain D. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *J Cell Physiol*. 2004;200:146-54.
- Desplantez T, Halliday D, Dupont E, Severs NJ, Weingart R. Influence of v5/6-His tag on the properties of gap junction channels composed of connexin43 connexin40 or connexin45. *J Membr Biol*. 2011;240(3):139-50.
- Diez JA, Ahmad S, Evans WH. Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus plasma membrane and gap junctions. *Eur J Biochem*. 1990;262:142-48.

Duncker BP, Davies PL, Walker VK. Introns boost transgene expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*. 1997;254:291-6.

Emes RD, Goodstadt L, Winter EE, Ponting CP. Comparison of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology. *Hum Mol Genet*. 2003;12(7):701-9.

Fan X, Petitt M, Gamboa M, Huang M, Dhal S, Druzin ML, Wu JC, Chen-Tsai Y, Nayak NR. Transient inducible placenta-specific gene expression in mice. *Endocrinology*. 2012;153(11):5637-44.

Fraga H, Fernandes D, Novotny J, Fontes R, Esteves da Silva JC. Firefly luciferase produces hydrogen peroxide as a coproduct in dehydroluciferyl adenylate formation. *Chembiochem*. 2006;7(6):929–35.

Gama-Sosa MA, De-Gasperis R, Elder GA. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct*. 2010;214:91-9.

GILBERT SE. *Developmental Biology*. ed Sinauer. 4a ed. 1994.

Gong X, Li E, Klier G, Huang Q, Wu Y, Lei H, Kumar NM, Horwitz J, Gilula NB. Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell*. 1997;91:833– 43.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(12):7380-4.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;15(12):5547-51

Gould SJ, Subramani S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem*. 1988;175(1):5-13.

Grasso P. In vivo effects of human follicle-stimulating hormone-related synthetic peptide hFSH-beta-(81-95) and its subdomain hFSH-beta-(90-95) on the mouse estrous cycle. *Biol Reprod*. 1998;58(3):821-5.

Green LM, LaBue M, Lazarus JP, Jennings JC. Reduced cell-cell communication in experimentally induced autoimmune thyroid disease. *Endocrinology*. 1996;137(7):2823-32.

Hennemann H, Dahl E, White JB, Schwarz HJ, Lalley PA, Chang D, Nicholson BJ, Willecke K. Two gap junction genes connexin 311 and 303 are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expresses in skin. *J Biol Chem*. 1992;58:81-9.

Hofker MH, Van Deursen H. *Methods in Molecular Biology. Transgenic Mouse Methods and Protocols* Humana Press. 2003.

Hogan B. Manipulating the mouse embryo. Ed CSH. 1986

Hojman P, Eriksen J, Gehl J. Tet-On induction with doxycycline after gene transfer in mice: sweetening of drinking water is not a good idea. *Anim Biotechnol.* 2007;18(3):183-8.

Houghton FD, Barr KJ, Walter G, Gabriel HD, Grummer R, Traub O, Leese HJ, Interhager E, Kidder GM. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. *Biol Reprod.* 2002;66:1403-12.

Huang T, Shao Q, Macdonald A, Xin L, Lorentz R, Bai D, Laird DW. Autosomal recessive GJA1 (Cx43) gene mutations cause oculodentodigital dysplasia by distinct mechanisms. *J Cell Sci.* 2013;126(13):2857-66.

Hunter AW, Jourdan J, Gourdie RG. Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. *Cell Commun Adhes.* 2003;10(6):211-4.

Isley MS, Tan IP, Roy C, Saez JC. Cell age and stage dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci.* 1002;103:81–96.

Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;71(4):1250–54.

Jiang JX, Goodenough DA. Heteromeric connexons in lens gap junctional channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1287-91.

Joyner AL, Sedivy JM. Gene Targeting: A Practical Approach Oxford University Press Oxford. 2000

Kandouz M, Bier A, Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA, Batist G. Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth. *Oncogene* 2004 Jun 10;23(27):4763-70

Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reprod.* 2002;123:613-20.

Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol.* 2006;174:677-87.

Kolber BJ, Boyle MP, Wiczorek L, Kelley CL, Onwuzurike CC, Nettles SA, Vogt SK, Muglia LJ. Transient early-life forebrain corticotropin-releasing hormone elevation causes long-lasting anxiogenic and despair-like changes in mice. *J Neurosci.* 2010;30(7):2571-81.

Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):5795-18.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-10.

Kumar NM, Gilula NB. Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin Cell Biol.* 1992;3:3-16.

Lacal JC, Perona R, Feramisco J. Microinjection. Springer; 1999.

Lagerkvist U. To split a gene. *Lakartidningen.* 1978;75(43):3892-4.

Le Provost F, Lillico S, Passet B, Young R, Whitelaw B, Vilotte JL. Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends Biotechnol.* 2010;28(3):134-41.

Lee SK, Teng Y, Wong HK, Ng TK, Huang L, Lei P, Choy KW, Liu Y, Zhang M, Lam DS, Yam GH, Pang CP. MicroRNA-145 regulates human corneal epithelial differentiation. *PLoS One.* 2001;621-49.

Lehman IR. DNA ligase: structure mechanism and function. *Science.* 1974;186 (4166):790–7.

Liao Y, Day KH, Damon DN, Duling BR. Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc Nat Acad Sci.* 2001;98:9989-94.

Lima BL, Santos EJ, Fernandes GR, Merkel C, Mello MR, Gomes JP, Soukoyan M, Kerkis A, Massironi SM, Visintin JA, Pereira LV. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. *PLoS One.* 2010;5(11):141-36.

Lobbestael E, Reumers V, Ibrahimi A, Paesen K, Thiry I, Gijsbers R, Van den Haute C, Debyser Z, Baekelandt V, Taymans JM. Immunohistochemical detection of transgene expression in the brain using small epitope tags. *BMC Biotechnol.* 2010;18:10-16.

Loew R, Heinz N, Hampf M, Bujard H, Gossen M. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnol.* 2010;24:10-81.

Makowskil A, Caspar DLD, Phillips WC, Goodenough DA. Gap junction structures II analysis of the X-ray diffraction data. *J Cell Biol.* 1977;74:629-45.

Malhotra A. Tagging for protein expression. *Methods Enzymol.* 2009;463:239-58

Manipalviratn S, Decherney A. Clinical application of human oocyte cryopreservation. *Rev Recent Clin Trials.* 2008;3(2):104-10.

Martínez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10(5):458-64.

McLachlan E, Shao Q, Laird DW. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol*. 2007;218(1):107-21.

Meier ID, Bernreuther C, Tilling T, Neidhardt J, Wong YW, Schulze C, Streichert T, Schachner M. Short DNA sequences inserted for gene targeting can accidentally interfere with off-target gene expression. *FASEB J*. 2010;24(6):1714-24.

Moisyadi S, Kaminski JM, Yanagimachi R. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009;32(2):47-60.

MOORE KL. Embriologia básica. 6ª ed. Elsevier; 2004

Moreira PN, Pozueta J, Pérez-Crespo M, Valdivieso F, Gutiérrez-Adán A, Montoliu L. Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Res*. 2007;16(2):163-8.

Mountford PS, Smith AG. Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet*. 1995;4:179-84.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51:263-73.

Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport phosphorylation and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol*. 1991;115:1357-74.

Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10:435-41.

Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9565-70.

Niessen H, Harz H, Bedner P, Krämer K, Willecke KJ. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 145-trisphosphate. *Cell Sci*. 2000;8:1365-72.

O'Brien J, Bruzzone R, White TW, Alubaidi MR, Ripps H. Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of connexin family. *J Neurosci*. 1998;18:7625-37.

Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Bussow H, Schilling K, Steinhauser C, Willecke K. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant

oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci*. 2003;23:4549–59.

Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta*. 2005;20;1719(1):6-23.

Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*. 2007;31(2):159-73.

Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):408-18.

Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988;334(6180): 320–5.

Pereira MSO, Houzelstein D, Cohen A, Vinci G, Abdelhay E, Robert B. Analysis Of The Mouse *Msx1* Gene Promoter Using Embryonic Stem Cell-Mediated Transgenesis. *Transgenics*. 1999;2:403-16.

Pfenniger A, Chanson M, Kwak BR. Connexins in atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(1):157-66.

Plück A, Klasen C. Generation of chimeras by microinjection. *Methods Mol Biol*. 2009;561:199-217.

Plum A, Winterhager E, Pesch J, Lautermann J, Hallas G, Rosentreter B, Traub O, Herberhold C, Willecke K. Connexin31- deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev Biol*. 2001;231:334– 47.

Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Bioch Bioph Acta*. 2005;1719:102-16.

Pouwels LJ, Zhang L, Chan NH, Dorrestein PC, Wachter RM. Kinetic isotope effect studies on the de novo rate of chromophore formation in fast- and slow-maturing GFP variants. *Biochemistry*. 2008;47(38):10111–22.

Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends Genet*. 1995;11(8):320-3.

Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hurler I, Xiang AP, Ren BZ, Lahn BT. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*. 2010;5(5)106-11.

Rash JE, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Kamasawa M, Zhang C, Michaels R, Restrepo D, Ottersen OP, Olson CO, Nagy JI. Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. *J Neurocytol*. 2005;34:307–41.

Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, Dembele D, Gourdon G, Nicole A, Duboc D, Wahbi K, Day JW, Fujimura H, Takahashi MP, Auboeuf D, Dreumont N, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18:840–5.

Reaume AG, De Sousa PA, Kulkarni LS, Langille BL, Zhu D, Daviest C, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 1995;267:1831-4.

Sandhu GS, Solorio L, Broome AM, Salem N, Kolthammer J, Shah T, Flaskand C, Duerk JL. Whole animal imaging WIREs. *Syst Biol Med.* 2010;2:398–21.

Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature.* 1997;385:525–9.

Small S, Kraut R, Hoey T, Warrior R, Levine M. Transcriptional regulation of a pair-rule stripe in drosophila, *Gene Develop.* 1991;5:827–39.

Smith J. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:149.

Soroldoni D, Oates AC. Live transgenic reporters of the vertebrate embryo's Segmentation Clock. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(5):600-5.

Southern JA, Young DF, Heaney F, Baumgärtner WK, Randall RE. Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol.* 1991;72(7):1551-7.

Spergel DJ, Krüth U, Shimshek DR, Sprengel R, Seeburg PH. Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter anatomical and physiological studies. *Prog Neurobiol.* 2001;63(6):673-86.

Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, Cooke PS. Role of connexin 43 in sertoli cells of testis. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1120:131-43.

Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta.* 2005;20(1):69-81.

Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005;1719:69–81.

Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z, Huang G. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J.* 2009;50:377-87.

Te Riele H, Maandag ER, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(11):5128-32.

Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:1252–55.

Travis J. Scoring a technical knockout in mice. *Science.* 1992;256(5062):1392-4

Tremml G, Singer M, Malavarca R. Culture of mouse embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2008;Chapter1:Unit1C4.

Valdimarsson G, Kidder GM. Temporal control of gap junction assembly in preimplantation mouse embryos. *J Cell Sci.* 1995;108:1715-22.

Van Steensel M AM, Spruijt L, van der Burgt I, Bladergroen RS, Vermeer M, Steijlen P M, van Geel MA. 2-bp deletion in the GJA1 gene is associated with oculo-dento-digital dysplasia with palmoplantar keratoderma. *Am J Med Genet.* 2005;132A:171-74.

Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1997;11(4):725-38.

Vinken M, Decrock E, Leybaert L, Bultynck G, Himpens B, Vanhaecke T, Rogiers V. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):2002-8.

Vreeburg M, De Zwart-Storm EA, Schouten MI, Nellen RGL, Marcus-Soekarman D, Davies M, van Geel M, van Steensel MAM. Skin changes in oculo-dento-digital dysplasia are correlated with C-terminal truncations of connexin 43. *Am J Med Genet* 2007;143A:360-63.

Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:419-40.

Wall RJ, Paleyanda RK, Foster JA, Powell A, Rexroad C, Lubon H. DNA preparation method can influence outcome of transgenic animal experiments. *Anim Biotechnol.* 2000;11(1):19-32.

Wall RJ. Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells.* 2001;3(4):209-20.

White TW, Goodenough DA, Paul DL. Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *J Cell Biol.* 1998;143:815– 25.

White TW, Paul DL. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annual Review of Physiology.* 1999;61:283–310.

Wiesen JF, Midgley AR. Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth. *Endocrinology.* 1993;133:741–46.

- Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol.* 1991;56:1-7.
- Willecke K, Jungbluth S, Dahl E, Hennemann H, Heynkes R, Grzeschik KH. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Europ J Cell Biol.* 1990;53: 275-280.
- Willwcke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 2002;383:725-37.
- Wouters M, Smans K, Vanderwinden JMW. ZsGreen/+: a new green fluorescent protein knock-in mouse model for the study of KIT-expressing cells in gut and cerebellum. *Physiol Genomics.* 2005;22(3):412-21.
- Xu HF, Ding YJ, Shen YW, Xue AM, Xu HM, Luo CL, Li BX, Liu YL, Zhao ZQ. MicroRNA-1 represses Cx43 expression in viral myocarditis. *Mol Cell Biochem.* 2012;362:141–48.
- Xu X, Li C, Garrett-Beal L, Larson D, Wynshaw-Boris A, Deng CX. Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches. *Genesis.* 2001;30(1):1-6.
- Ya J, Erdstieck-Ernste EBHW, De Boer PAJ, Van Kempen MJA, Jongsma H, Gros D, Moorman AFM, Lamers WH. Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res* 1998;82:360-66.
- Yagi T, Ikawa Y, Yoshida K, Shigetani Y, Takeda N, Mabuchi I, Yamamoto T, Aizawa S. Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(24):9918-22.
- Yamazaki H, Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD, Yamamoto M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking all three small Maf proteins. *Mol Cell Biol.* 2012;32(4):808-16.
- Yancey SB, Biswal S, Revel JP. Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junction protein connexin43 during mouse gastrulation and organogenesis. *Development.* 1992;114:203–12.
- Yancey SB, John SA, Lal R, Austin BJ, Revel JP. The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization topology and functional domains. *Journal Cell Biology.* 1989;108(6):2241-54.
- Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen Z, Wang A. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med.* 2007;13:486–91.

Zakany J, Tuggle CK, Patel MD, Nguyen-Huu MC. Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron*. 1988;1(8):679-91.

Zhang J, Zhao J, Jiang WJ, Shan XW, Yang XM, Gao JG. Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012;13(7):511-24.

Zubiaga AM, Belasco JG, Greenberg ME. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol*. 1995;15(4):2219-30.