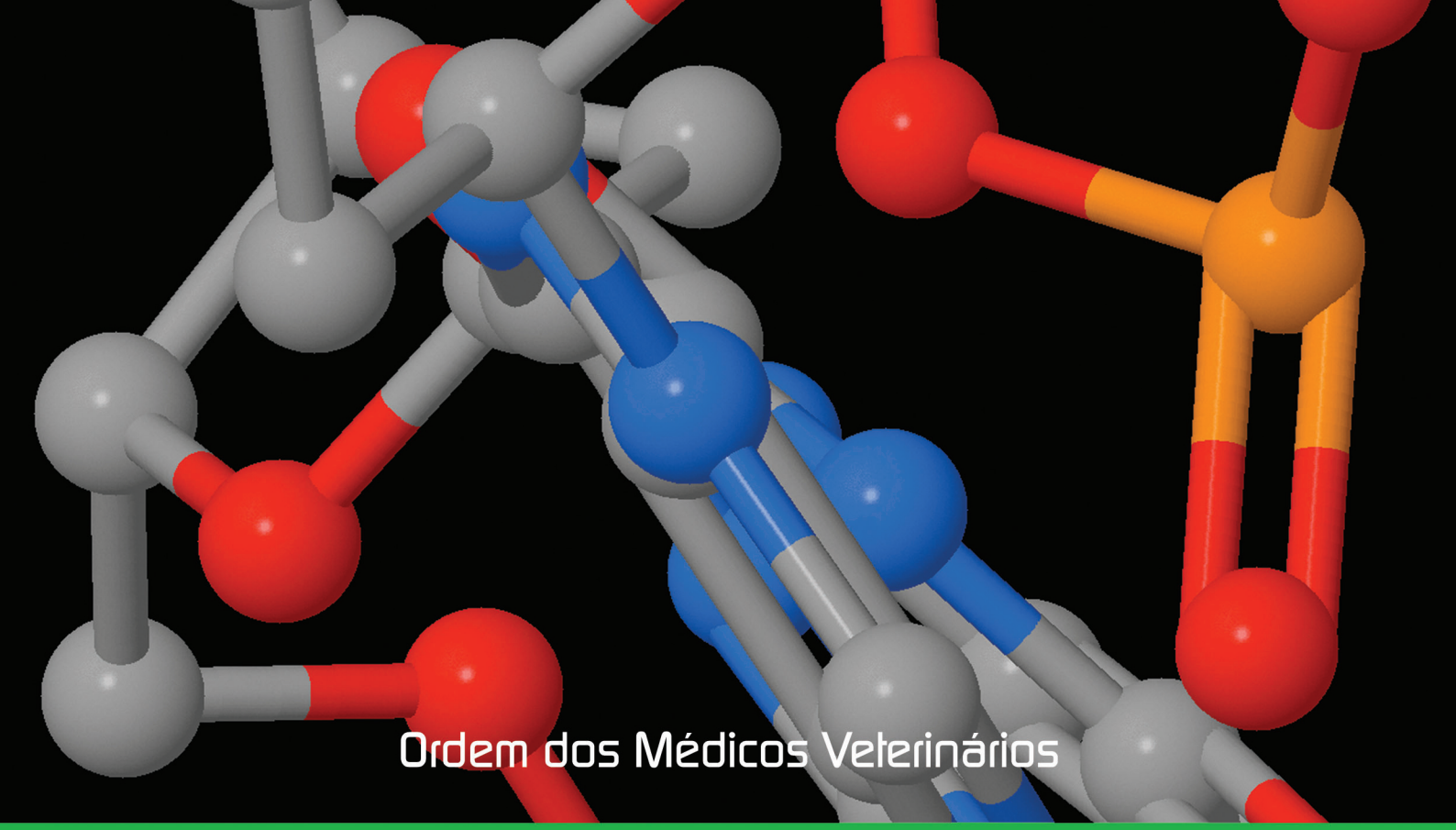


Introdução à Biotecnologia Animal Moderna

Elementos de Biologia Molecular Animal

José Henrique Rocha Dias Correia
António Agostinho Dias Correia

•

2007

ORDEM DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS

Introdução à Biotecnologia Animal Moderna

2007

J. H. R. Dias Correia e A. A. Dias Correia

CIISA. Departamento de Morfologia e Função.(Bioquímica)
Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa
Rua Prof. Cid dos Santos
Pólo Universitário da Ajuda 1300-477 Lisboa,Portugal
e-mail: jhrdcorreia@fmv.ud.pt

ÍNDICE GERAL

I – MANIPULAÇÃO GENÉTICA DOS ANIMAIS **5**

Nota Introdutória **6**

Prefácio **7**

II – CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO (NT) NOS ANIMAIS **64**

III – TRANGÉNESE DOS ANIMAIS **103**

INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA ANIMAL "MODERNA"

ÍNDICE

Nota Introdutória 6
Prefácio 7

I - Manipulações genéticas nos animais

1 – Manipulações genéticas nos animais e alguns dos meios e formas dessas manipulações. 11

1.1 – Introdução 11
1.2 – Manipulação genética dos animais 13
1.3 – Construção em geral de vectores com DNA exógeno 17
1.4 – Métodos para transferir genes para células animais em cultura 21
1.5 – Alguns métodos para realizar gene "targeting" 23
Vectores de inserção 24
Vectores de substituição 26
Recombinação sítio específico 28
1.6 – Substituição de genes e animais transgénicos. Marcadores positivos e negativos 34
1.7 – Recombinação 38
Recombinação homóloga 39
Recombinação não homóloga 41
1.8 – Obtenção de animais knockout 41
1.9 – Manipulação genética de animais para fins experimentais 42

2 – Outros exemplos de manipulação genética de animais. 44

2.1 – Obtenção de animais experimentais 44
2.2 – Geneterapia em animais 48
2.2.1 – Aspectos da geneterapia clássica 52
2.2.2 – Aspectos da geneterapia não clássica 53
2.2.2.1- Geneterapia e inibição de genes alvo e correcções de mutações in vivo 53
2.2.2.1.1 – Ao nível nucleico 55
A- Gene "targeting" 55
B – Inibição da transcrição 55
C – Inibição da tradução 55
C1 – Transgene RNA – anti-sense 55
C2 – ODN, oligodeoxinucleotidos anti-sense e PNA 56
C3 – Ribozimas 56
- Inibição de genes ao nível do RNA com ribozimas e construção destes 57
- Caso especial de reparação de mutação ao nível do m RNA por ribozimas. 58
2.2.2.1.2 – Ao nível proteico 58
- Anticorpos intracelulares (intrabodies) e aptameros
2.2.3 – Geneterapia em desordens hereditárias 59
2.2.4 – Geneterapia em situações neoplásicas e de doenças infecciosas 61

3 – Bibliografia 63

INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA ANIMAL "MODERNA"

Nota introdutória

Este trabalho não se destina a especialistas em biotecnologia animal ou em manipulações geneticas dos animais, pretendendo apenas ser um trabalho de divulgação e vulgarização destas matérias para médicos veterinários generalistas.

Assim toda a informação nele contida resultou de uma consulta sinóptica e compilação de variadíssimos textos que se indicam tendo as sinteses por nós elaboradas das diversas fontes, sido ordenadas e seriadas da forma que nos pareceu mais indicada para os fins em vista.

Na maioria dos sub-capítulos, após a respectiva designação, são referidas as fontes a partir das quais foram feitas as sinopses, salientando-se depois ao longo do texto que lhe correspondem algumas citações complementares de outras fontes utilizadas.

Prefacio

Na definição de Biotecnologia os dicionários clássicos referem ser ela "a fusão da Biologia com a Tecnologia e consistir na aplicação de técnicas biologicas, envolvendo DNA recombinante, fusão de células e novas técnicas de bioprocessamento" (Medical dictionary definitions).

Contudo processos biotecnológicos tinham sido utilizados desde tempos remotos da antiguidade como era o caso da produção de bebidas alcoolicas 6000 a.c. ou da panificação e de outras bebidas fermentadas 2000 a.c.

Pode afirmar-se que a chamada biotecnologia "moderna" teve o seu início a partir da data em que Arthur Kornberg em 1955 descobriu o complexo enzimático responsável pela síntese biológica do DNA a que se seguiram as novas técnicas de manipulação genetica como as do DNA recombinante e da fusão celular.

A. Kornberg e S. Ochoa receberam o prémio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1959 por terem descoberto os meios pelos quais as moléculas de DNA eram duplicadas e os meios para reconstruir este processo de duplicação em tubos de ensaio.

Na pecuária a inseminação artificial e a transferência de embriões tiveram o seu advento pouco antes do "desenvolvimento da engenharia genética (alteração directa do material genético) ou tecnologia do DNA recombinante" a partir da década de 70 do século passado.

Através da biotecnologia animal moderna procura-se condicionar as propriedades hereditárias dos animais vivos em ordem a torná-los mais úteis e vantajosos dentro do contexto da sua criação, exploração e/ou utilização.

Isto decorre através da manipulação genética desses animais o que pode traduzir-se numa exaltação, modificação, supressão ou inserção do próprio material genético ou ainda pela modelação da expressão genética existente, através da regulação da indução ou do silenciamento dessa expressão.

A biotecnologia animal é uma matéria transversal que nos cursos de Medicina Veterinária não tem aparecido individualmente num corpo de disciplinas, ao contrário do que sucede por exemplo com a tecnologia dos produtos de origem animal.

Os conteúdos transversais da biotecnologia animal passam no entanto pelas matérias de genética, biologia molecular e celular, bioquímica, fisiologia, citologia, embriologia, obstetrícia e reprodução animal, bioinformática, etc, e têm profundas implicações em todas as aplicações da Medicina Veterinária, através de todas as suas patologias e consequentes terapêuticas e farmacologias,epidemiologias e saude pública veterinária, sem esquecer as matérias de zootécnia e melhoramento animal com o suporte da nutrição.

Embora se encontre ainda um pouco distante a manipulação genética ampla e rotineira dos animais, muitíssimos êxitos foram no entanto alcançados quanto a clonagem e transgenese em diferentes espécies animais e com diversos objectivos, produtivos, terapêuticos, preventivos, correctivos, etc,etc.

Vislumbra-se num futuro não muito remoto que estas matérias assumirão extraordinária importância em todo o mundo animal, à medida que se forem conhecendo técnicas e meios mais eficientes para a sua caracterização e manipulação. Tudo isto nos leva a encarar a biotecnologia animal como uma matéria fundamental a introduzir nos cursos de graduação em Medicina Veterinária .

À medida que forem sendo desbravados, identificados e caracterizados, nos mapas genéticos das diversas espécies animais, os factores estruturais e reguladores implicados nas diversas patologias, bem como os condicionalismos epigenéticos que neles intervêm e simultaneamente sejam descobertos e disponibilizados meios para as intervenções correspondentes desejáveis ou justificáveis, consoante os fins em vista,estaremos no dealbar de uma nova era para o desempenho pleno e objectivo da medicina veterinária molecular a todos os níveis.

Não partiremos dos sintomas e do diagnóstico diferencial para presumir, atingir ou corrigir as presumíveis causas desses efeitos.

Saberemos em cada situação os desenhos moleculares identificados e a sua correspondência com os padrões normais (via informática) e a partir das diferenças verificadas poderão ser inferidas e prevenidas quais as consequências correlativas que poderão surgir, a curto ou a longo prazo, e melhor ainda, como atacar a raíz do problema corrigindo as moléculas implicadas no desencadear dessa situação.

Será também a terapêutica individual instituída à medida da população molecular e celular alterada (qualitativa e quantitativamente).

Embora as biotecnologias disponíveis no momento presente sejam relativamente limitadas não temos dúvidas em afirmar que no futuro há medida que elas forem sendo melhoradas e ampliadas dar-se-á uma revolução muito profunda nos sectores da biologia aplicada, como é o caso da medicina veterinária, que passará a ser desempenhada e estudada em moldes inteiramente novos.

Será urgente pois ir acompanhando este sector da ciência em ordem a poder integra-lo dentro do contexto tradicional das Ciências Veterinárias.

Justifica-se neste momento, plenamente, nos cursos de graduação em medicina veterinária por esse mundo fora, a introdução à biotecnologia animal como uma disciplina com uma componente básica e fortes aplicações depois nas áreas das patologias e clínicas, da produção e melhoramento animal e na área da inspecção sanitária dos produtos animais e da saúde pública veterinária.

No contexto da biotecnologia animal e da respectiva manipulação genética há que considerar as técnicas básicas para essa manipulação e a sua aplicação na transformação de células animais e de animais.

Nas técnicas básicas utilizáveis nas manipulações genéticas nos animais, salientam-se o papel e características dos veículos vectores para muitas manipulações genéticas, a electroforese em gel de agarose para fraccionamento, isolamento e caracterização do material genético trabalhado, assim como o "blotting" desse material (DNA, RNA ou proteínas) e a hibridação de ácidos nucleicos e/ou proteinas , e ainda a PCR (polimerase com reacção em cadeia) para clonagem de material genético e obtenção de quantidades trabalháveis e analisáveis desse material.

As operações de corte ou junção do material genético(por ex: DNA) e os meios disponíveis para esse efeito, tal como os tipos de vectores utilizáveis e as suas características, são o pano de fundo em que decorrem muitas dessas manipulações genéticas.

Torna-se depois necessário efectuar a manipulação genética propriamente dita no animal ou nas celulas utilizadas para esse efeito, inclusive as técnicas de clonagem e/ou transgenese e os meios disponíveis para confirmar a sua efectivação e caracterização. Avultam em toda a linha as técnicas de isolamento, cultura e selecção das células e tecidos.

No conjunto de textos que vamos apresentar em duas fases [uma 1ª fase (A) já a seguir e uma 2ª fase (B e C) em vias de realização e a apresentar futuramente] sob o lema "Introdução à biotecnologia animal", abordaremos vários aspectos que passamos a referir:

1ª Fase:

A- No contexto das manipulações genéticas operáveis

- Manipulação genética de animais e alguns meios e formas dessa manipulação, com alguns exemplos de obtenção de animais para fins experimentais ou para efectivação de geneterapia.

- Clonagem e transplantes nucleares (N.T.), factores condicionantes e exemplos e características de algumas clonagens.

- Transgenese, "gene targeting" e transgenes, sua implementação nos animais, alguns aspectos peculiares e espécies animais transgénicas.

2ª Fase:

B- No contexto de alguns meios celulares animais utilizáveis em manipulações genéticas

- Linhagens e linhas celulares animais, alguns aspectos biológicos importantes. Células estaminais e celulas progenitoras. Diferenciação celular. Isolamento, identificação e plasticidade celular.

C- Como pano de fundo implicado nas manipulações genéticas nos animais

- Cromatina, sua arquitectura e função, domínios no núcleo celular, topologia, remodelação da cromatina,e alguns factores epigenéticos do seu controlo.
- Reprogramação nuclear após N.T., seus condicionalismos e características.
- A embriogénese nos animais, algumas características das oogonias e do oócito, desenvolvimento dos embriões e embriogénese nos mamíferos, aves e peixes. Marcadores de celulas embriónicas. Diferenciação. Crescimento. Implantação. Metabolismo. Transcriptoma e proteoma dos embriões. Rede reguladora dos genes no início do embrião.

No dealbar do século XXI e no contexto da cultura médico veterinária actual, a biotecnologia animal, a manipulação genética, a clonagem e/ou transgenese dos animais pode configurar diversos aspectos tais como:

- Ser um meio para preservar espécies animais em perigo potencial de extinção.
- Constituir uma ferramenta para nos animais domésticos inclusive das espécies pecuárias, conseguir animais resistentes a determinados tipos de doenças ou animais com mais elevadas produções de carne, leite, ovos,faneros, etc ou de alcançar efectivos pecuários com características mais interessantes de outra natureza e porventura mais proveitosas.
- Levar certas espécies animais clonadas e transgénicas à produção de produtos terapêuticos ou alimentares de interesse não só para seres humanos mas também para outros animais ou para outras finalidades.
- Utilizar algumas espécies animais como alfobres de celulas e tecidos compatíveis com xenotransplantes variados.
- Construir linhas dentro de algumas espécies animais que possam servir como modelos de variadas patologias e doenças humanas ou outras e como tal constituírem poderosos meios para avanços médicos e biotecnológicos.

- Nos animais de companhia pode admitir-se que a clonagem e a transgenese por ora ainda muito incipiente possam permitir no futuro finalidades reprodutivas e terapêuticas que revolucionem as tradicionais práticas médico veterinárias do mundo actual, desde o prolongamento afectivo das pessoas por esses animais, como até uma prática de eventuais clonagens terapêuticas a partir do próprio doente que implicariam toda uma renovada actividade da clínica veterinária assistente.

Estas matérias começaram a ter bastante desenvolvimento nos últimos tempos e justifica-se numa perspectiva médico veterinária uma revisão e actualização dos aspectos mais salientes de toda esta panorâmica.

Manipulações genéticas nos animais

1- Manipulações genéticas nos animais e alguns dos meios e formas dessas manipulações

1.1 – Introdução

Após a sequenciação completa do genoma de algumas espécies animais torna-se possível, numa perspectiva clínica, um exame genético mais preciso não só para identificar desordens genéticas mas também a susceptibilidade para uma série de diversas situações inclusive de doenças infecto-contagiosas (Strachan, T& Read, AP-1999).

Além desta possível identificação genética envolvida em diversos tipos de situações também começa a ser possível melhorar os tratamentos passiveis de serem utilizados inclusive com o recurso a novas terapias.

A comparação e análise da totalidade dos genomas permite estudos em larga escala da organização e evolução do DNA, assim como da expressão dos genes neles compreendidos e das suas funções. (Strachan, T & Read A.P., 1999).

A possível comparação de uns genomas com outros genomas é hoje acessível através de meios informáticos adequados, sendo possível identificar a extensão da semelhança ou dissemelhança de vários aspectos dos genomas, ou identificar sequências presentes ou ausentes num ou noutro genoma.

É assim factível, através desta genómica comparativa, caracterizar as possíveis interrelações evolutivas entre diversas espécies ao longo de milhões ou milhares de anos, ou ainda identificar genes ou elementos do DNA reguladores desses genes.

No que se refere á identificação de genes o despiste e rastreio electrónico de base de dados EST pode permitir identificar genes homólogos biologicamente importantes entre as diversas especies animais (Strachan T& Read, A.P.,1999).

No que se refere aos elementos reguladores nos genomas eucariotas a informação é escassa mas também o rastreio nas bases de dados de sequências reguladoras conhecidas, através de programas de computação adequados, pode ajudar a inspeccionar as novas sequências disponíveis, embora com uma eficiência muito baixa.

Também o funcionamento dos genes, ou seja a forma como uma célula responde a um determinado sinal ou estímulo proveniente do seu meio envolvente, pode ser monitorizado analisando ao mesmo tempo os perfis de expressão de cada gene. Hoje é possível por técnicas adequadas como por exemplo as de "microarray" rastrear simultaneamente milhares de genes ou inclusivamente todos os seus produtos (transcriptoma para o conjunto de todos os RNA transcriptos pela celula, e proteoma para o conjunto de todas as proteínas/polipéptidos expressos pela célula). Hoje uma disciplina de grande impacto dentro da proteomica é o estudo das variações globais da expressão das proteínas e das interacções proteínas-proteínas entre si.

O cerne de toda a biotecnologia animal passa pelas moléculas de DNA endógenas da célula (ou seja do substrato a manipular ou transformar) ou do DNA exógeno (o construído in vitro e veiculado através do DNA dos vectores utilizados ou seja o DNA transformador).

Afigura-se neste contexto ser de extraordinária importância o conhecimento de algumas propriedades dessas moléculas de DNA que intervêm em todas as manipulações genéticas envolvidas.

Os papéis capitais de qualquer uma dessas moléculas de DNA são o de se replicar, antecedendo portanto cada multiplicação celular, ou de serem transcritas em determinados locais ao longo da sua estrutura em ordem a originarem a respectiva expressão, expressão essa muitas vezes condicionável por diversíssimos factores inclusive epigenéticos.

Estes papéis capitais são específicos de cada tipo de molécula de DNA e podem ser relativamente manipulados por operações biotecnológicas adequadas com objectivos determinados.

As moléculas de DNA para se multiplicarem devem ter uma origem para a replicação sendo por isso chamadas essas sequências replicões. No entanto fragmentos desse DNA que não são replicões e na ausência de replicação diluem-se para fora das células hospedeira que as albergam. (Primrose, S,B.et alli, 2001).

No entanto mesmo que uma molécula de DNA possua uma origem para replicação, esta pode não funcionar numa outra célula hospedeira diferente.

Se os fragmentos de DNA não se replicam, uma forma de resolver este problema pode ser o de os ligar a replicões adequados que são designados como vectores ou veículos de clonagem, (Primrose, S.B. et all, 2001).

Os plasmideos por exemplo são replicões que são estavelmente herdados num estado extracromossomal, existindo a maioria deles, como moléculas de DNA circular em hélice dupla.

Os plasmideos possuem diferentes configurações estruturais podendo “enrolar-se” e “desenrolar-se” e nem todos os plasmideos existem como moléculas circulares, havendo alguns lineares sendo necessário nestes últimos protegê-los nas suas extremidades para evitar a sua digestão nucleásica.

O DNA linear é degradado muito rapidamente nas células mamíferas e por isso vectores plasmideos superenrolados de alta qualidade são utilizados. Cada DNA circular convalentemente fechado tende a permanecer estável apenas por 1-2 dias na maioria das células animais, mas isto é suficiente para vários ensaios de expressão transitória e não de expressão estável. (Primrose, S.B. et all, 2001)

Os plasmideos codificam algumas das proteínas necessárias para a sua própria replicação, por vezes só uma, utilizando como outras proteínas necessárias para a replicação, as do próprio hospedeiro.

Pequenos plasmideos e bacteriofagos são por si só replicões e são pois vectores adequados, e a sua manutenção não necessita da sua integração no genoma hospedeiro, podendo o seu DNA ser isolado numa forma intacta. (Primrose, S.B. et ali, 2001)

Moléculas de DNA estranho (exógeno) podem por engenharia genética ser inseridas numa molécula vectora, originando tal combinação moléculas recombinantes artificiais. Este processo é também denominado de clonagem molecular ou clonagem de genes, dado que é possível obter uma linha de organismos geneticamente idênticos, ampliando a molécula composta.

No entanto a clonagem de um fragmento de DNA exógeno ou DNA "target" num vector necessita que o DNA vector possa ser purificado e cindido para o abrir, sendo o DNA exógeno inserido na molécula do vector para originar uma molécula recombinante artificial. Isto implica portanto métodos de cisão e junção das moléculas de DNA endógeno e exógeno (o que significa a existência de sequências próprias para essas cisões e uniões) que têm que ser finamente controladas, sendo depois a molécula recombinante artificial construida inserida para efeitos transformantes numa célula hospedeira adequada. (Primrose, S. B. et all, 2001)

Muitas vezes a clonagem de fragmentos de DNA não é conseguida com produtos resultantes da PCR, em virtude das polimerases utilizadas possuirem uma actividade transferase terminal, havendo no entanto metodologia para contornar esta situação e conseguir ligar o fragmento da PCR com a molécula de DNA vectora. (Primrose, S.B. et all, 2001)

1.2 -Manipulação genética dos animais
(Strachan,T&Read, A.P-1999)

Pode afirmar-se neste contexto que uma nova era começou na investigação com animais, quando em princípios de 1980 se conseguiu pela primeira vez modificar genéticamente animais através da sua inserção com DNA exógeno. (Strachan, T&Read, A.P-1999)

Estas novas metodologias permitiam estudar a expressão e o funcionamento dos genes animais através da inserção de genes na totalidade do organismo do animal ou então promover a sua delecção selectivamente ou ainda modificar simples genes previamente escolhidos.

Por outro lado através desta manipulação genética dos animais era possível alterar mesmo um único gene num animal vivo, em ordem a conseguir imitar mutações análogas em genes correspondentes e que se sabia ocorrerem em por ex: genes humanos, contribuindo assim para criar modelos animais experimentais para estudar determinadas doenças.

Para alcançar em profundidade estas manipulações genéticas dos animais é necessário modificar o DNA inclusive das células das linhas germinativas em ordem a tornar os efeitos destas manipulações, hereditárias.

Para isto o DNA estranho ou exógeno, para construir um novo animal, deve ser introduzido em células com capacidade para se diferenciarem e produzirem outras células inclusive das linhas germinativas.

É o caso dos óocitos fertilizados ou de células de embriões em estadios iniciais de formação, sobretudo células estaminais embriónicas (ES) todas elas capazes de gerar células somáticas e células germinativas.

Na maioria dos animais, as células somáticas, e as células germinativas separam-se cedo nas primeiras etapas de desenvolvimento dos embriões o que leva, para obter animais transformados na linha germinativa, á introdução do DNA exógeno em celulas totipotentes antes portanto do estadio de desenvolvimento em que se formam as linhas celulares germinativas.

A introdução de DNA estranho ou exógeno nas células de um animal produz um animal transgénico, sendo a molécula de DNA exógeno o transgene que pode conter um ou mais genes diversos.

A introdução de DNA exógeno num óocito fertilizado ou numa célula de um embrião em início de formação, pode originar pois um animal transgénico que pode ter capacidades para transmitir á sua linha germinativa esse DNA exógeno.(Strachan, T&Read, A.P-1999)

Os transgenes na maioria dos casos integram-se nos cromossomas da célula hospedeira sem alterar a expressão de qualquer gene endógeno destas celulas, mas por vezes produzem alterações na expressão dos genes endógenos (mutação de inserção) e como tal no fenótipo dos respectivos animais (efeitos de posição). (Strachan, T&Read, A.P-1999)

Na manipulação genética por gene "targeting" a mutação é introduzida com precisão num determinado gene endógeno escolhido, podendo pois ser um método de mutagenese "in vitro". Isto tanto pode ser feito em células somáticas como em células estaminais embriónicas em cultura, sendo este último caso, se possível, preferível pois pode originar mais facilmente um animal construído que contém em todas as suas células a mutação desejada e no locus respectivo. Infelizmente apenas a partir do ratinho e humanos (recentemente foi assinalado também, duvidosamente em aves) se tem conseguido, por ora, obter células estaminais embriónicas, passíveis de se replicar estavelmente duradouramente.

No entanto a partir de 1997, Ian Wilmut e col., abriram novas perspectivas para a manipulação genética de outros animais mamíferos. Passou assim a ser possível nos mamíferos a transferência ou transplante de um núcleo (N.T.) de uma célula somática adulta derivada de uma linha celular estabelecida, para um óocito enucleado e as consequentes tecnologias de gene "targeting" ensaiadas criaram uma outra via alternativa para a obtenção de animais transgénicos.

Os animais transgénicos assim obtidos como por exemplo ovinos e bovinos podem servir inclusivamente como biorreactores fornecendo produtos medicamentosos valiosos.

Antes de 1997 a via que era habitual para obter animais transgénicos utilizava a injecção pronuclear de transgenes. Contudo a eficácia desta metodologia é muito pequena, em relação á clonagem por N.T., obtidas tendo como células dadoras de núcleo, células fetais contendo o transgene.

Na transgenese o DNA exógeno pode ser transferido para células totipotentes ou pluripotentes de células embriónicas (oócitos fertilizados ou células de embriões em início de formação, ou células estaminais embriónicas em cultura) sendo depois esse DNA exógeno transferido para os cromossomas da célula hospedeira. Aqui esse DNA exógeno pode ser integrado nos cromossomas do oócito fertilizado originando um animal com todas as suas celulas, inclusive as da linha germinativa, contendo o transgene, ou então a integração do DNA exógeno nos cromossomas ocorre mais tarde, num estádio pós-zigótico e nestas circunstâncias forma-se um animal "mosaico" em que apenas algumas células contém o transgene. (Strachan, T&Read, A.P-1999)

Se o transgene se encontrar em linhas de células germinativas podem passar á descendência.

A técnica outrora utilizada de injecção pronuclear do transgene em ratinho, envolvia a necessidade de ter as fêmeas superovuladas, copuladas por machos férteis, fêmeas essas sacrificadas no dia seguinte ao coito. Os oócitos assim fertilizados eram recolhidos e depois o transgene injectado com dispositivo especial, no prónúcleo masculino de um oócito e reimplantado este no oviduto de uma fêmea de aluguer onde se desenvolvia até ao seu termo. (Strachan, T&Read, A.P-1999)

O transgene microinjectado integra-se ao acaso nos cromossomas do oócito, apenas num local (embora por vezes se integre em dois locais), integrando-se diversas cópias do transgene nesse local, na forma de concatameros (cabeça de uma molécula ligando-se com a cauda de outra molécula) podendo encontrar-se 50 ou mais cópias do transgéne em cada local de inserção nos cromossomas do oócito.(Strachan, T&Read, A.P-1999)

A injecção de transgenes em oócitos fertilizados é um processo difícil de executar e não permite manipulações genéticas sofisticadas.

Para este efeito e no caso do ratinho, uma técnica preferível é a transferência do transgene para células estaminais embriónicas em cultura "in vitro" (que retêm a sua potencialidade para gerar todos os tecidos do ratinho inclusive células da linha germinativa) e estas depois injectadas num blastocisto hospedeiro a reimplantar numa ratinha pseudográvida.

Nestas últimas circunstâncias o embrião gerado é uma quimera pois contem células das células estaminais embriónicas que foram injectadas com o transgene, e células do blastocisto em que aquelas foram injectadas.

Nos animais assim gerados é depois possível com cruzamentos adequados obter ratinhos plenamente transgénicos.

As células estaminais embriónicas do ratinho têm a vantagem de crescerem francamente em cultura podendo operar-se durante esta uma série de manipulações genéticas e controlá-las antes de as injectar nos blastocistos hospedeiros e antes de reimplantar estes nos animais onde se irão desenvolver até ao seu termo.

A presença do gene desejado pode ser assinalada e confirmada por exemplo pelo ensaio PCR "assay" e pela presença de um marcador introduzido durante a construção do DNA exógeno.

As células estaminais embriónicas têm ainda capacidade para permitir o gene "targeting" por recombinação homóloga (vide adiante) com a modificação de um único gene prédeterminado.

Como já referimos desde 1980 que se têm obtido linhas celulares estáveis de células estaminais embriónicas de ratinho, mas não de outras espécies mamíferas.

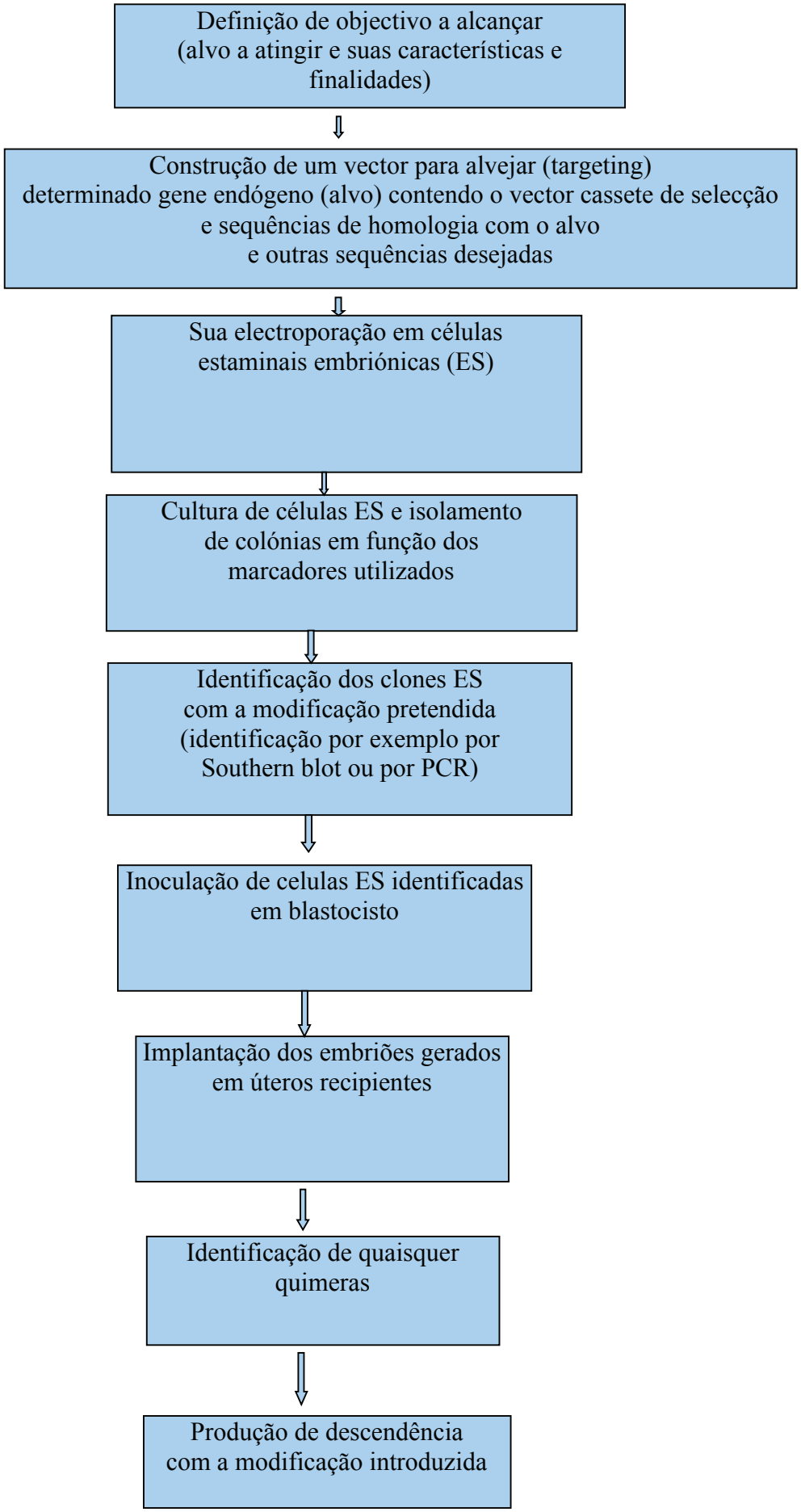
Na clonagem dos animais a expressão clone, recorda-se, indica identidade genética. A tecnologia da transferência de núcleo (N.T.) foi primeiramente utilizada para a clonagem de embriões na qual a célula dadora de núcleo podia provir de animais mais produtivos, ou por exemplo de cavalos de corrida premiados, animais de companhia muito estimados ou de espécies de animais em vias de extinção.

Prevê-se que as melhorias tecnológicas para clonagem de animais permitam num futuro próximo, ir muito mais além neste campo, como por exemplo na obtenção de animais transcromossómicos. Cromossomas artificiais de mamíferos têm sido produzidos, com capacidade para transferir centenas e possivelmente milhares de genes para animais transgenicos, podendo isto ser feito com a tecnologia de transferência de núcleos mais do que com a utilização de células estaminais embriónicas.

Recentemente tem sido possível realizar a transferência de cromossomas completos ou fragmentos de cromossomas para células estaminais embriónicas. (Strachan, T&Read, A.P-1999)

Está descrito por Tomizuka e col. (Strachan, T&Read, A.P-1999) em 1997 a transferência de cromossomas humanos ou seus fragmentos obtidos de fibroblastos normais, para celulas estaminais embriónicas de ratinho, originando ratinhos transcromossómicos quiméricos podendo ser transmitidos pela linha germinativa esses cromossomas.
Dá-se seguidamente Figura 1 um exemplo da estratégia, em várias etapas, a utilizar para construção de ratinhos geneticamente modificados por gene "targeting". (Van DerWeyden et ali, 2002)

Figura 1


Definição de objectivo a alcançar
(alvo a atingir e suas características e
finalidades)
Construção de um vector para alvejar (targeting)
determinado gene endógeno (alvo) contendo o vector cassete de selecção
e sequências de homologia com o alvo
e outras sequências desejadas
Sua electroporação em células
estaminais embriónicas (ES)
Cultura de células ES e isolamento
de colónias em função dos
marcadores utilizados
Identificação dos clones ES
com a modificação pretendida
(identificação por exemplo por
Southern blot ou por PCR)
Inoculação de celulas ES identificadas
em blastocisto
Implantação dos embriões gerados
em úteros recipientes
Identificação de quaisquer
quimeras
Produção de descendência
com a modificação introduzida

1.3-Construção em geral de vectores com DNA exógeno (Brown, T.A., 2001)

Referimos seguidamente de Brown, T.A., 2001, algumas definições importantes neste contexto.
"Um vector é um veículo ou seja uma molécula de DNA tendo inserido um gene destinado a construir uma molécula de DNA recombinante, e capaz de se replicar num organismo hospedeiro."

A "clonagem de genes consiste na inserção de um fragmento de DNA portador de um gene, num vector de clonagem e depois a propagação dessa molécula de DNA recombinante num hospedeiro adequado. No entanto a clonagem de genes também pode ser alcançada sem a utilização de vectores de clonagem como sucede, por exemplo, na transferência directa de genes."

Os vectores para "targeting"são construídos contendo cassetes para selecção e sequências de homologia com o locus alvo, sendo depois linearizados antes da sua transferência ou da electroporação para células hospedeiras adequadas.

A " homologia entre dois genes de diferentes organismos provenientes da evolução de um mesmo gene ancestral, têm habitualmente uma sequência suficientemente similar para poderem hibridizar entre si."

Uma "cassete é uma sequência de DNA, para ser inserida num hospedeiro eucariota, contendo um promotor – um local de restrição único – e uma sequência para poliadenilação sendo essa cassete transportada para certos tipos de vectores de expressão. Um gene exógeno inserido no local de restrição única da cassete do vector fica sob o controlo do sinais da expressão."(Brown, T.A., 2001)

Na construção de qualquer DNA exógeno para introduzir numa celula animal há que atender a diversas circunstâncias tais como o que se pretende com a introdução do DNA exógeno através de vector adequado. Pretende-se inactivar um gene, corrigir a sua expressão ou aumentá-la, inserir um gene novo, emendar uma mutação, tratar uma situação patológica?, etc.

Tratando-se de manipular um determinado gene quais são as suas características estruturais, a sua localização, funcionamento, regulação, etc?

A estratégia subsequente para a construção do DNA exógeno, será função, portanto, dos objectivos da sua inserção nas celulas animais, o tipo de células que se utilizarão para este efeito, os meios a utilizar para a sua penetração nelas, a eficiência destas tecnologias, os métodos para a sua detecção, isolamento e cultura das células que integraram a construção exógena, etc.

Só depois de tudo isto se desenhará quais as sequências que a construção deve conter e a sua ordenação dentro do vector. Terão que haver na maior parte dos casos sequências homólogas entre o vector construído e o gene endógeno, para permitir a recombinação homóloga, elementos reguladores activos, marcadores de diversos tipos positivos e/ou negativos e a sequência correspondente ao gene desejado.

Desenho de vectores para gene "targeting" (Van der Weyden, et all., 2002)

Este tipo de vectores são vectores plasmideos especializados que promovem a recombinação homóloga (vide adiante) quando introduzidos em células adequadas. Para isto é necessário a inclusão de uma região homóloga ou seja uma região que é homóloga do gene alvo "target", permitindo que o vector alvejante

sinapse com o DNA endógeno. O tamanho da região homóloga e a taxa de sequências idênticas são importantes para a eficiência deste gene "targeting".

A recombinação é também mais eficiente se o vector for linearizado antes da transfecção.

Estas metodologias são utilizadas para romper loci endógenos originando alelos nulos (gene knockout), podendo utilizar-se vectores de inserção ou vectores de substituição (vide adiante).

Os vectores de inserção são linearizados dentro da região homóloga, levando á inserção de todo o vector no interior do locus alvo (target) o que leva a uma duplicação das sequências adjacentes ao marcador "selectable", podendo esta duplicação de sequências alvo levar a uma subsequente recombinação homóloga que restaura o genótipo inicial.

Nos vectores de substituição a região de homologia é colinear com o alvo. O vector é linearizado fora da região de homologia antes da transfecção o que origina que o DNA endógeno é substituído pelo DNA exógeno, inserindo apenas as sequências compreendidas entre as regiões homólogas e não o resto da estrutura do vector, podendo mesmo a região de homologia ser interrompida.

Os vectores de substituição são os mais utilizados para "knockouts".(Quadro 1 e 2)

Quadro 1

Sequências a considerar no desenho de vectores de substituição
(Van der Weyden, et all., 2001)

- Podem conter genes marcadores para selecção positiva das células
- Podem conter genes marcadores para selecção positiva – negativa das células(Quadro 3)
- Podem conter genes marcadores para metodologias "hit e run" ou induzíveis Cre-Lox P, ou outras.
- Deve conter o gene pretendido e desenhado (a sequência de substituição)
- Deve incluir um sinal para poliadenilação (Poly A)

Quadro 2

Aspectos importantes a atender no desenhodos vectores de substituição
(Van der Weyden, et all., 2001)

- O tamanho das zonas de homologia de um lado e do outro do locus a alvejar, deve ter ~5-10 Kb.
- A fonte do vector é importante (de preferência deve ser isogénica)
- Os clones devem ser rastreados por hibridização, Southern e PCR.
- Utilizar sondas fora dos braços de homologia se isso interessar
- É importante remover os marcadores utilizados
- O tamanho da construção deve ser de cerca de 20Kb

No caso dos ratinhos é conhecido que a integração de vectores apenas ocorre em 10 a 40% dos animais, sendo a maior taxa de integração a observada na etapa de uma célula apenas, situação em que todas as células derivadas desta conterão o transgene. Em 20 a 30% dos casos a integração pode ocorrer em etapas mais avançadas, originando mosaicismo.

Nas construções de DNA para obter a expressão maximizada dos transgenes em células animais devem observar-se aos seguintes princípios (vide figura 2 seguinte) (Van der Weyden, et all., 2001 e Primrose, S.B. et ali, 2001Box 10.2)

A – Utilizar promotores constitutivos, fortes, se possível que funcionem em diversos tipos de células.

B – Incluir um intrão heterólogo que inclua elementos reguladores essenciais que favoreçam a expressão nas células animais.

C – Utilizar transgenes genómicos grandes que incluam intrões e grandes quantidades de sequências flanqueadoras do gene, assim como vários favorecedores (enhancers), elementos reguladores e isoladores para proteger o transgene de efeitos de posição.

D – Utilizar transgenes que actuem dominantemente.

E – Utilizar a integração em local específico, ou seja num locus conhecido por não promover efeitos de posição negativos. O sistema Cre/Lox P (vide adiante) tem sido utilizado nas células mamíferas com esta finalidade.

F – Incluir um sinal de poliadenilação. Este sinal (terminador) nos genes encariotas gera uma determinada e definida terminação 3' no respectivo m RNA, terminação esta necessária para a exportação do m RNA para o citoplasma.

G – Remover as sequências não traduzidas desnecessárias de vários comprimentos em 5' e 3' para maximizar a expressão da construção.

H – Optimizar o transgene para efeito de tradução através do codão ou codões optimizados (o melhor codão para a expressão de um dado ácido aminado) para a expressão do transgene nesse hospedeiro.

I – Incorporação de um sinal alvo que assegure que o produto da expressão do transgene seja conduzido para o compartimento subcelular correcto para aí ser apropriadamente modificado, mesmo com a utilização de péptidos sinal heterólogos.

Figura 2

Expressão de genes exógenos
Bases da construção de um vector transgene

1-Promotor 2-Intrão 3-Transgene 4-Poly A

Legenda da Figura 2

1 – Promotor
Para conduzir especificamente a expressão do gene em relação a uma dada célula, tecido ou momento em que deve ser expresso.

2 – Intrão
Por vezes fornecem elementos reguladores essenciais

3 – Transgene
Expressando o DNA para o gene que interessa com ou sem mutações ou contendo sequências de outro organismo, etc.

4 – Poly A
Para exportação, do produto expresso, para o citoplasma.

Quadro 3
Marcadores frequentemente
utilizados na construção de vectores
para gene "targeting"(Van der Weyden, et all., 2002)

Cassete de selecção	Gene	Selecção	Produto químico no meio de cultura para selecção
- Blasticina S deaminase	bsr	+	- blastocidina S
- Fragmento da toxina A da difteria	DTA	-	- não são necessários
- Timidina cinase de virus Herpes simplex	HSVTK	-	- Ganciclovir, Fiau
- Higromicina B, fosfotransferase	hpp	+	- Hygromicina B
- Neomicina fosfotransferase	neo	+	- Neomicina sulfato (G418)
- Puromicina – N-acetiltransferase	puro	+	- Puromicina
- Fusão de puromicina-N-acetiltransferase- Timidina cinase	pu ▲ tk	+/-	- Puromicina/ganciclovir, Fiau
- Xantina/guanina fosforibosil transferase	gpt	+/-	Acido micofenólico/6 tioxantina

Fiau= 1 (1,2 – deoxi-2-fluoro-B-D-arabinofuranosil)-5-iodouracil

Legenda do Quadro anterior

Os marcadores de selecção positiva (+) servem para isolar as raras células que integraram o vector construído (cerca de 1 em 10^4 células tratadas).

Os marcadores negativos (-) eliminam diversas subpopulações celulares das células transfectadas.

Nos vectores construídos estes marcadores estão associados com alelos contendo promotores e favorecedores (enhancers) podendo portanto estes interferir com outros genes ligados ao locus o que leva à necessidade da remoção rotineira dos marcadores introduzidos, por meios adequados (como pode ser a recombinação homóloga ou a utilização de recombinases específicas do local). (Van der Weyden, et all., 2002)

1.4 - Metodos para transferir genes para células animais em cultura (Stratchan, T & Read, A.P., 1999)

Encontram-se disponíveis diversas técnicas para introduzir DNA em diferentes tipos de celulas animais em culturas, para efeitos de estudar o seu funcionamento e a consequente regulação dos genes, ou para produzir quantidades substanciais de proteínas recombinantes. Este último facto, a obtenção de proteínas recombinantes representa uma vantagem das células animais em relação ás bactérias e fungos, uma vez que as células animais operam modificações pos-tradução nos produtos de expressão desses genes ao contrário das bactérias e fungos. (Primrose, S.B. et all., 2001)

A introdução de DNA em celulas animais "in vivo" têm sido ensaiada também para efeitos de geneterapia.

Os diversos tipos de vectores utilizáveis para transferir genes para as células animais, dependem dos tipos de linhas celulares a utilizar, originárias de mamíferos ou de insecto (por ex: neste último caso são utilizados sistemas de expressão com baculovírus).

Apesar das vantagens dos vectores virais, como meios de transferência de factores terapêuticos para celulas animais, problemas relacionados com a sua segurança e inocuidade, apontam para a necessidade de melhorar outras metodologias não virais para esse efeito.

Ao contrário do que sucede nas plantas, a maioria das células animais não são utilizáveis para produzir animais transgénicos, sendo as celulas estaminais embriónicas do ratinho uma das excepções.

A transferência de genes para celulas animais pode ser feita essencialmente por dois tipos de processos .(Primrose, S.B. et all., 2001)

A- Por transformação mediada pelo DNA, por exemplo por métodos de transfecção química, electroporação ou por métodos de transferência directa em que a transformação pode ser feita com DNA não replicante ou então a transformação pode ser alcançada com vectores replicões.

B- Por transdução viral

As vias mais frequentemente utilizadas para a transferência de genes para as células animais são:

1º – A transferência directa do DNA, por exemplo por meios físicos como a microinjecção ou o bombardeamento nas plantas.

2º – A transfecção com a tomada do DNA do meio envolvente por meios químicos (Liposomas por ex:) ou por meios físicos (electroporação por exemplo).

3º – A colocação do DNA num invólucro de um vírus animal, que o transmite ás células.

A transferência de genes por transdução viral para células animais embora muito eficiente (o transgene é incorporado dentro da partícula viral) tem os inconvenientes já referidos. Esta transdução ou transferência de genes feita através de vírus de DNA como é o caso do SV40, adenovirus, etc e vírus RNA como é o caso dos retrovírus, embora eficientes, a produção de vírus recombinantes é morosa e implica regulamentos e a satisfação da bio-inocuidade e exigindo condições laboratoriais muito próprias.
A transfecção baseada em duas estratégias, não virais, tem uma eficiência muito variável consoante o tipo de células receptoras, havendo as metodologias que utilizam moléculas transportadoras (métodos químicos) e metodologias que veiculam os ácidos nucleicos directamente para o citoplasma receptor (métodos físicos).

Nos métodos químicos com a ajuda de moléculas transportadoras, como o fosfato de cálcio e a DEAE – dextrana formam-se com o DNA exógeno co-precipitados à superficie das células alvo o que aumenta a eficiência da transfecção.

Também Lipossomas artificiais a que o DNA exógeno se liga formando vesículas, fundem-se com a plasma membrana das células alvo (lipofecção) e permitem a penetração desse DNA exógeno no interior das células.

O transporte de DNA exógeno ajudado pelo fosfato de cálcio é muito dependente do pH e não é eficiente em muitos tipos de células, podendo ser muito tóxico até, para celulas em culturas primárias.

Os lípidos catiónicos dos lipossomas têm tido maior sucesso sendo mais eficientes, podendo fazer a transfecção de DNA, RNA e oligonucleotidos.

Hoje estão comercializados reagentes para transfecção que associam lípidos e outros reagentes e que actuam com muito maior eficiência, em mais de 600 tipos de células inclusive em células em culturas primárias.

Nas metodologias para a transfecção directa dos ácidos nucleicos exógenos incluem-se a electroporação, o bombardeamento com ácidos nucleicos revestidos com partículas transportadoras (gene com tiro) e a microinjecção. A electroporação é um método muito utilizado e baseia-se num choque eléctrico que despolariza temporariamente a membrana das células alvo, permitindo assim a passagem de grandes moléculas de DNA exógeno. No entanto o equipamento necessário para o efeito é caro e pode desencadear efeitos citotóxicos.

O DNA exógeno transferido para células animais é primeiramente introduzido na célula (fase de transfecção) e numa segunda etapa é incorporado no genoma da célula (fase de integração). A primeira fase é muito mais eficiente que a segunda fase, o que significa que muito do DNA transfectado nunca será integrado no genoma celular, sendo portanto muito desse DNA exógeno (desde que não contenha em si origens de replicação) mantido no núcleo num estado extracromossal, subsistindo por pouco tempo, antes de ser diluído e degradado, o que representa uma transformação transitória.

No entanto, uma pequena população das celulas transfectadas com esse DNA exógeno, integra este DNA no respectivo genoma originando uma transformação estável, que leva à formação de uma linha celular que veicula e expressa o transgene (DNA exógeno).

Esta pequena população celular com o transgene é identificada e isolável através de marcadores incorporados e selecção correspondente.

A transformação estável é necessária para experiências de longa duração ou para a produção de produtos da sua expressão a longo prazo.

A transformação transitória é suficiente para determinar por exemplo a eficiência de certos promotores incorporados na transgene.

1.5 - Alguns métodos para realizar gene "targeting" (Primrose, S.B. et all., 2001, Strachan, T&Read, A.P-1999, 21.3 Van der Weyden, et all., 2002)

As células estaminais embriónicas (ES) do ratinho, tal como algumas células somáticas e outras de diversas espécies animais permitem o gene "targeting" e o gene "trapping".

O gene "targeting" (utilizando a recombinação homóloga para alterar genes endógenos específicos) é o melhor meio para controlar a produção de mutações.

O gene "Trapping" é um sistema de mutação com marcadores moleculares que permitem evidenciar os genes mutados.

As construções para obter o gene "trapping" são vectores para mutações por inserção, adaptados para fornecerem informação acerca da região genómica onde se integram. Tais vectores contêm um gene assinalante cuja expressão é activada por elementos reguladores do DNA envolvente.

No caso do gene "targeting" por recombinação homóloga podem obter-se animais com uma mutação num gene preciso dentro de uma célula intacta. Esta mutação pode originar a inactivação da expressão desse determinado gene (mutação knockout) ou a alteração dessa expressão, ou ainda pode corrigir uma mutação patogénica restaurando o fenótipo normal.

No gene "targeting" a mutação é introduzida através da recombinação homóloga. Para isso o gene exógeno ou fragmento de gene, clonado, com uma sequência intimamente relacionada com a do gene alvo endógeno, é transfectado para células apropriadas e em algumas destas ocorre uma recombinação homóloga (vide adiante) entre o gene exógeno ou seu fragmento, e o gene endógeno homólogo situado na célula transfectada. Isto tem sido alcançado em células ES de ratinho e também em células somáticas mamíferas como por ex: mioblastos, fibroblastos, etc.

Uma vez alcançada essa recombinação homóloga as células onde ela ocorreu podem ser injectadas em blastocistos de mães de aluguer e assim alcançar-se a mutação do gene desejado em todas as células nucleadas.

A recombinação homóloga ocorre raramente nas populações de células mamíferas em culturas, mas é tanto maior quanto mais elevada for a homologia das sequências do gene exógeno transfectado com as do gene endógeno homólogo alvo.

No caso dos ratinhos sabe-se que o gene exógeno clonado a ser transfectado deve de preferência ser isogénico (derivado da mesma estirpe do ratinho que fornece as células ES).

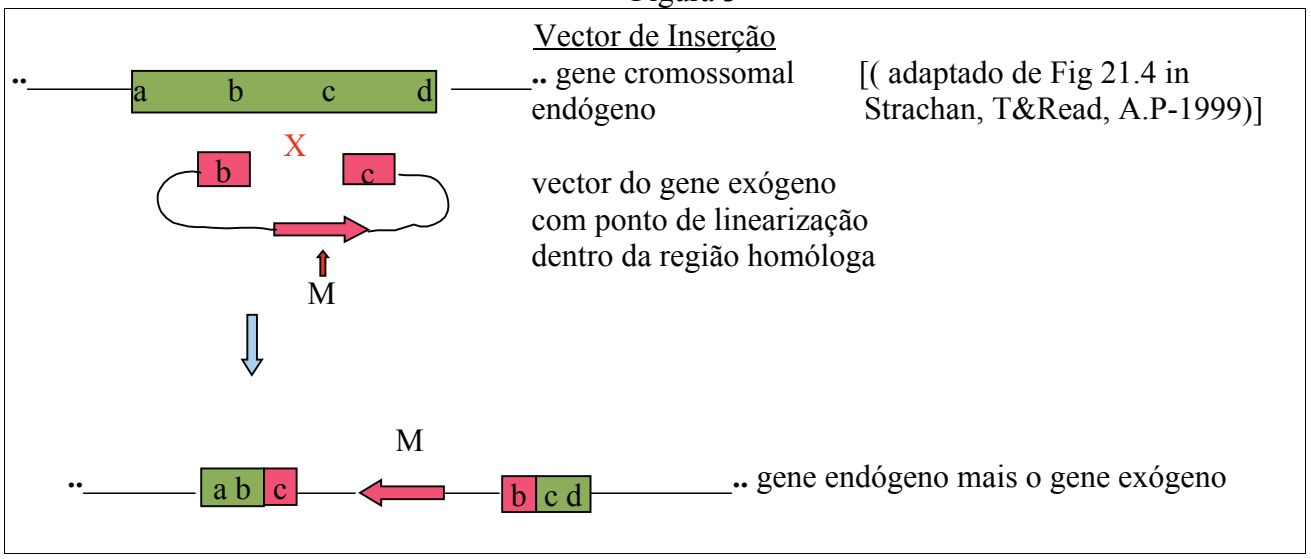
Para ajudar a identificação das células em que ocorreu a recombinação homóloga, deve o gene exógeno conter um gene marcador que permite a selecção das células positivas.

A transferência desta construção contendo o gene exógeno ou seu fragmento para as células apropriadas pode ser feita por exemplo por electroporação podendo, no gene "targeting" por recombinação homóloga, ser utilizados vectores de inserção e vectores de substituição.

Vectores de Inserção
(Strachan, T & Read, A.P-1999)

Os vectores de inserção alvejam o locus que contem o gene endógeno de interesse, através de uma única recombinação, o que leva à inserção da totalidade da construção do gene exógeno, inclusive a própria sequência do vector, acabando por originar uma mutação por knockout.(Figura 3)

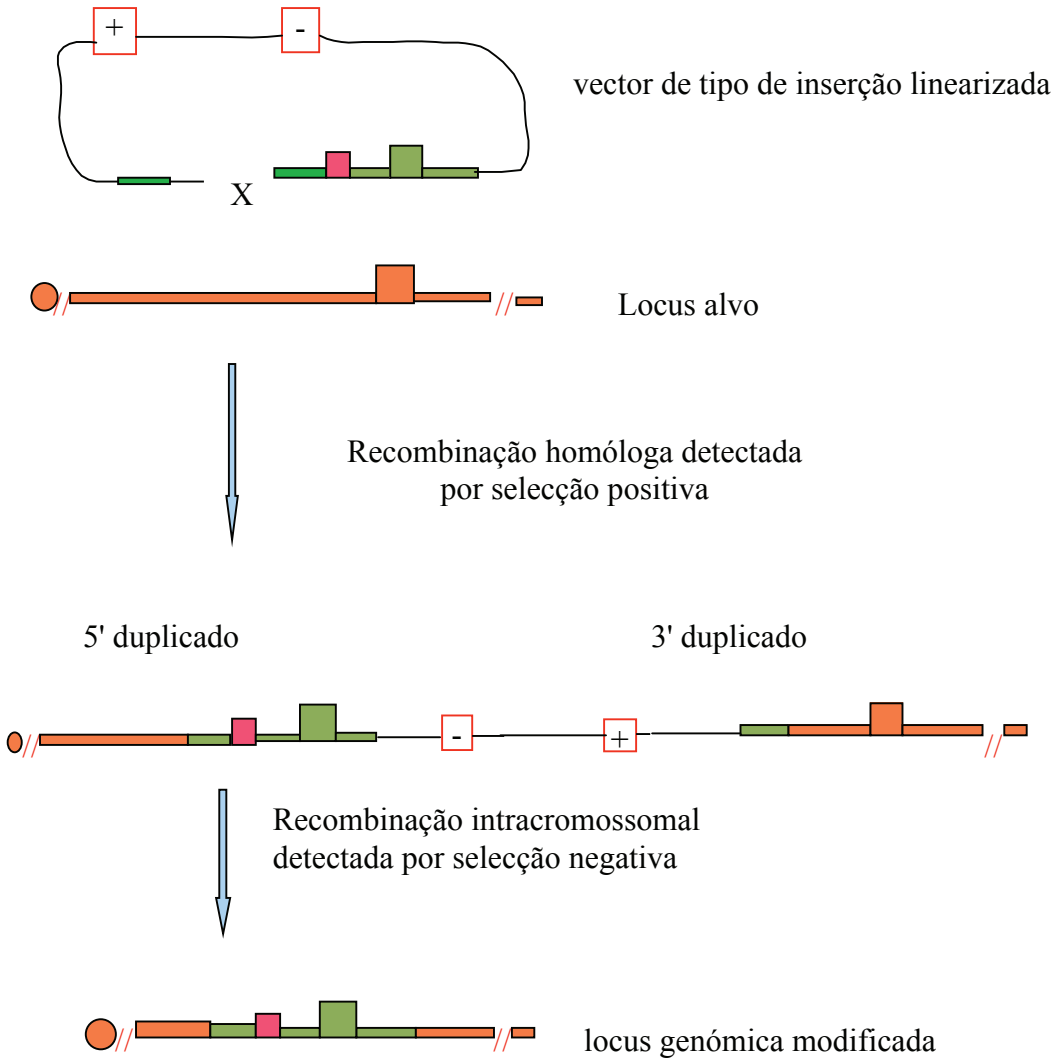
Figura 3



Na figura o vector é cindido num único ponto dentro da sequência idêntica ou muito parecida com o gene cromossomal endógeno. A recombinação homóloga em X integrou a totalidade do vector contendo o DNA exógeno e o marcador M, no DNA cromossomal endógeno.

No esquema da figura 4 seguinte no processo de gene "targeting" Hit-and-run, o vector de inserção permite a inclusão de pequenas mutações dentro do genoma (Van der Weyden, et all., 2002).

Figura 4
Processo de gene targeting hit- and- run
(adaptado de in Van der Weiden L.er alli; 2002)



Legenda

Nestas duas etapas, o vector de inserção contem sequências homólogas ( ) do gene alvo ( ) sequências essas no vector com uma pequena modificação mutação ( ), contendo também marcadores positivo (+) e negativo (-)fora da região de homologia, enquanto a mutação está dentro da região de homologia.

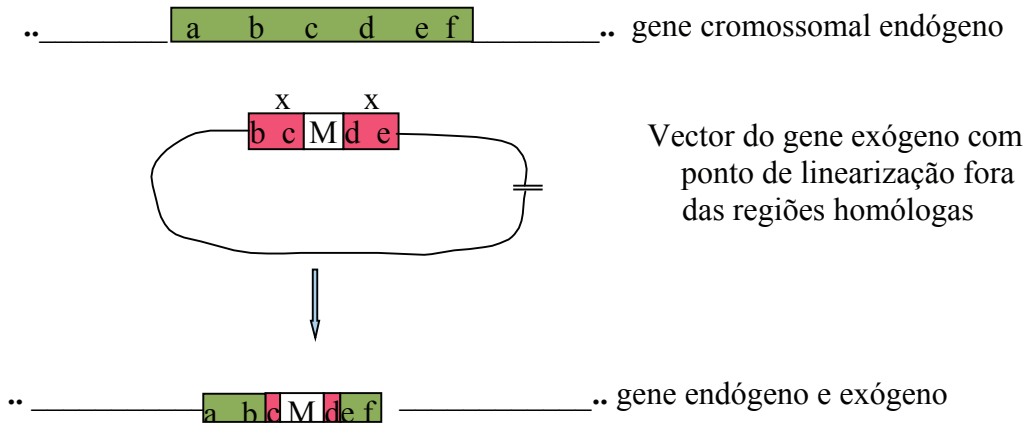
Na 1ª etapa da recombinação homóloga gera-se uma duplicação do gene alvo (através da inserção do vector) seguida pela excisão da duplicação via uma segunda recombinação homóloga entre as sequências homólogas duplicadas.

Vectores de substituição
(Strachan, T&Read, A.P-1999)

Os vectores de substituição substituem alguma sequência do gene endógeno cromossomal por uma sequência de DNA exógeno mas através de uma recombinação homóloga recíproca dupla ou por conversão de gene podendo assim inactivar o gene endógeno, ou corrigir uma mutação patogénica. (Figura 5)

Figura 5

Vector de substituição
(adaptado de fig 21.4 in Strachan, T & Read, A.P. 1999)

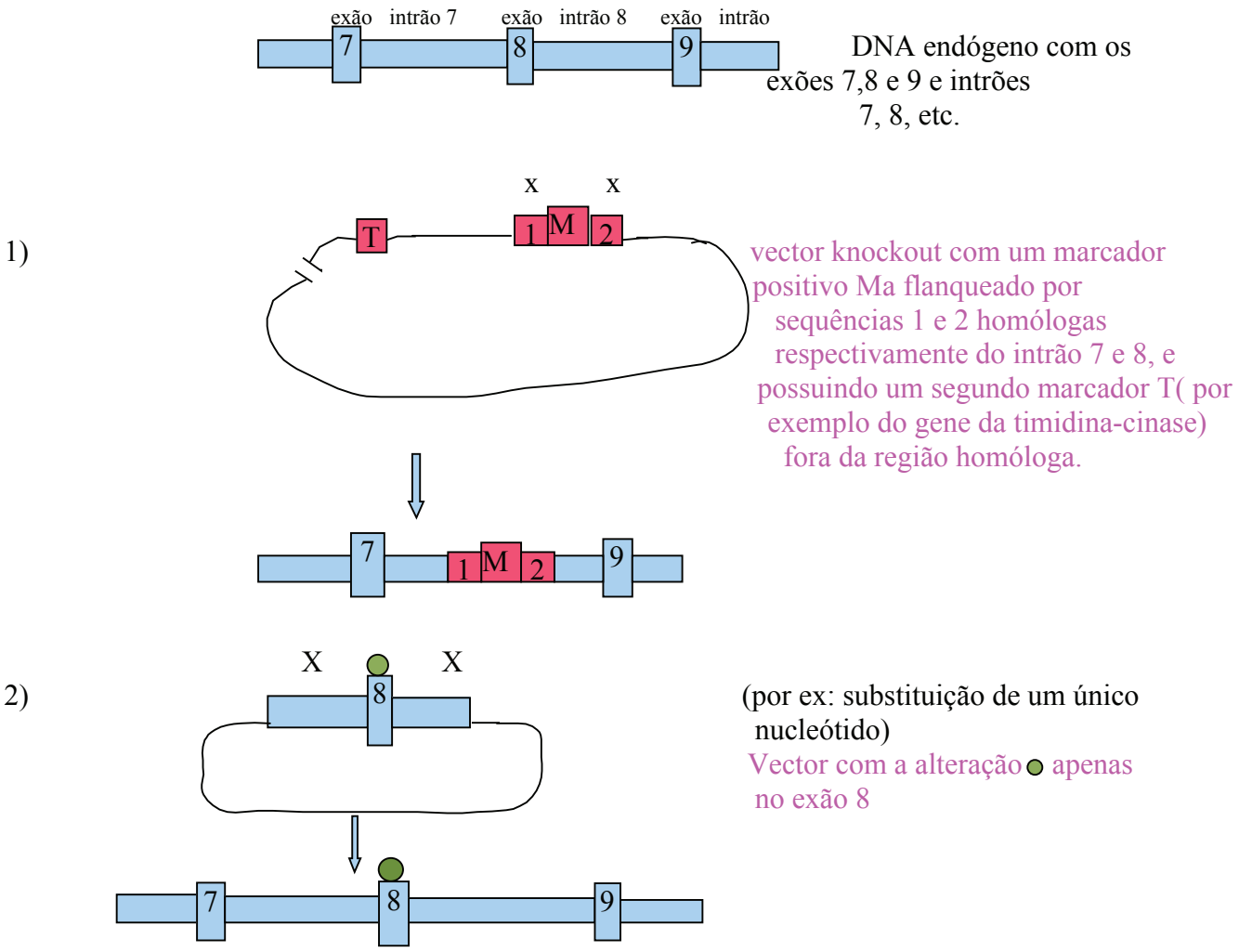


Uma dupla recombinação dos genes em X e X, ou seja, a conversão dos genes, origina a substituição das sequências internas c e d dentro do gene cromossomal endógeno pelas sequências homólogas c e d do vector inclusive o marcador M.

O vector foi cortado num único local fora da sequência homóloga:
Qualquer das metodologias antes referidas, com vectores de inserção e vectores de substituição permitem a introdução de quantidades substanciais de sequências exógenas de DNA dentro de genes endógenos.

Mas em certas circunstâncias pretende-se mutação mais simples, como por exemplo uma mudança num simples codão. Para esta última situação técnicas de recombinação em duas etapas podem permitir modificações genéticas sem introduzir nas células e nos animais resultantes, sequências estranhas, não podendo pois neste caso intitulá-los como transgénicos. (Strachan, T&Read, A.P-1999). (Figura 6)

Figura 6
Gene targeting com dupla substituição para introduzir uma mutação subtil
(adaptado de fig. 21.5 in Strachan, T & Read, A.P., 1999)



A conversão do gene endógeno, ou seja a dupla crossover XX dentro das regiões nos intrões flanqueadores do codão 8 a modificar, substitui o codão 8 pelo gene marcador Ma que permitirá fazer a selecção das células em que ocorreu essa situação.

A selecção das células em que ocorreu essa integração é feita pelo sistema positivo-negativo, a selecção na 1ª etapa de substituição escolhe portanto as células Ma+ e T-.

As células que efectuam integrações ao acaso do vector conterão o gene marcador T e podem ser mortas com um análogo adequado (por exemplo, análogo da Timina) no meio de cultura de células.

Na 2ª etapa de substituição é introduzido por um vector o exão 8 modificado com uma mutação pontual num único nucleotideo (verde na figura) que vai substituir o gene Ma e que pode ser seleccionado nas culturas que o integram como células negativas para este marcador ou seja Ma-.

No caso dos ratinhos o gene "targeting" tem sido muito utilizado para produzir nesses animais, modelos artificiais de diversas doenças humanas.

Estão a ser comercializados por algumas empresas do sector, mais de 2000 modelos diversos destes ratinhos knockout, que necessitam no entanto de sistemas de manutenção e manipulação muito especializados.

Contudo em certas circunstâncias podem ser utilizados outros processos de knockout como é o caso da técnica do knock-in em que o transgene utilizado para promover o knockout de um gene alvo endógeno é ele próprio construído para ser expresso sob o controlo de elementos cis-actuantes do gene Knockout.

Recombinação sítio-específica(ou especifíca de um local) (Primrose, S.B. et all., 2001, chap 13)

A recombinação sítio-específica amplia o poder ou capacidade do gene "targeting" e difere da recombinação homóloga.

A recombinação homóloga é um processo ubíquo baseado nas enzimas recombinantes endógenas que estão presentes em cada célula, enquanto sistemas de recombinação sítio-específicos são muito especializados e são diferentes encontrando-se, contudo, em diferentes organismos e podendo ser inseridos em diversas células.

A recombinação homóloga ocorre entre sequências de DNA com longas regiões de homologia, mas sem qualquer sequência específica particular, enquanto a recombinação sítio-específico ocorre em sitios curtos, e de reconhecimento específico, o que significa que os sítios alvo para a recombinação sítio-específica podem ser introduzidos facilmente e sem obstrução, em transgenes, mas a recombinação apenas ocorrerá numa célula heteróloga se for também fornecida uma recombinase.

Há uma série de sistemas de diferentes recombinações sítio-específicas, sendo uma das mais utilizadas a que envolve a Cre recombinase.

Gene "targeting" utilizando o sistema de recombinação Cre-Lox P para inactivar um gene apenas num determinado tipo de célula e/ou tecido ou num determinado momento (Primrose, S.B. et all., 2001, chap 13)

A função natural da recombinase Cre (causus recombination) é promover a recombinação entre duas sequências Lox P que se encontrem na mesma orientação numa molécula de DNA.

A sequência Lox P consiste de 34 bp e compreende duas repetições invertidas de 13 bp separadas por um espaçador central assimétrico de 8 bp (vide figura 7 seguinte) e que lhe confere orientação.

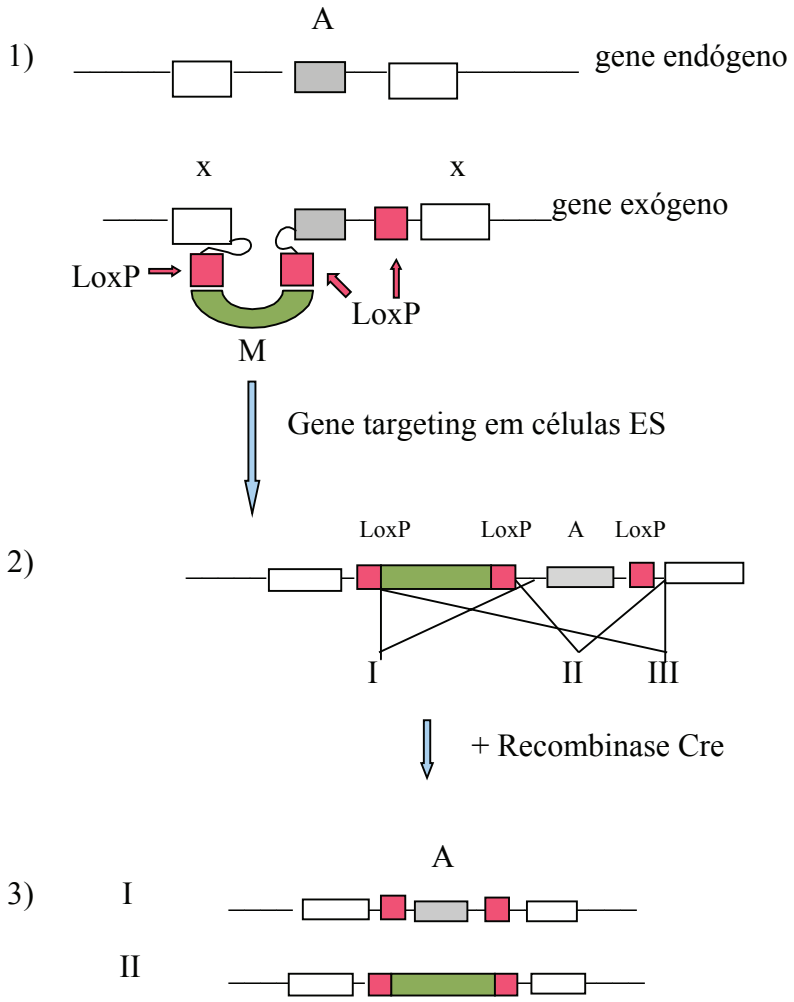
Figura 7
Estrutura da sequência Lox P

(adaptado da Fig.21.7 in Strachan, T & Read, A.D., 1999)

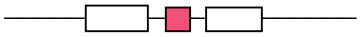
Certos genes são indispensáveis para o desenvolvimento inicial dos embriões e dos animais e o seu simples knockout muito precoce pode desencadear a morte em etapas iniciais da vida do embrião. Atendendo a esta realidade foram desenvolvidos métodos para apenas inactivar a expressão de genes alvo, em determinadas células dos animais. O animal nestas circunstâncias pode sobreviver e o resultado do knockout pode ser estudado no tecido ou tipo celular que interessa.

Um método geral para este efeito é abordado seguidamente.(Figura 8)

Figura 8
Gene targeting por inactivação de um gene num tipo de celula escolhida, pelo sistema de recombinação Cre-LoxP

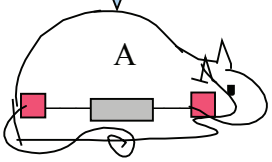


III



4) Selecção das células ES do tipo I

5)



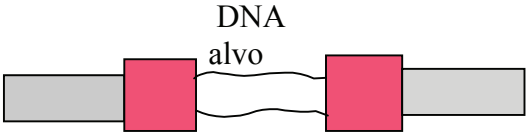
(adaptado da Fig. 21.8 in Strachan, T & Read, A. P., 1999)

No exemplo em cima o objectivo era o de inactivar o gene A fazendo a sua deleção numa célula ou tecido específico, no locus alvo.

1) O gene endógeno no locus A foi recombinado homólogamente (x)com um DNA exógeno construído onde foram inseridos no locus A, três locais LoxP) e um marcador ( ) M. Isto foi realizado em células ES de ratinho.

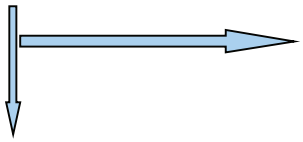
2) Estas células ES foram subsequentemente transfeccionadas com um gene de recombinase Cre e a expressão deste gene originou a recombinação entre os locais loxP introduzidos, originando diferentes tipos de produtos, (tal como representamos em 3).

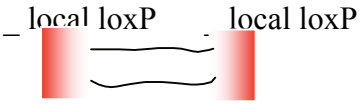
3) Quando a enzima Cre se liga aos locais LoxP, ela corta os locais Lox a meio e depois junta as duas metades, após a remoção do DNA alvo.



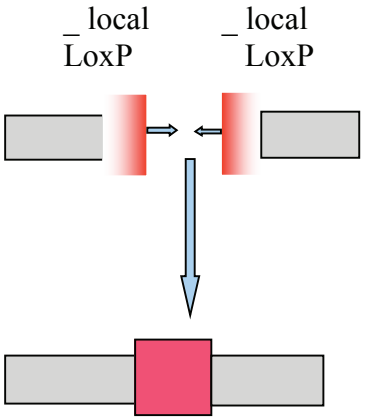
(Cre – Lox P recombination
http://www.bio.davidson.edu/courses/
genomics/méthod/Cre LoxP html)

locais Lox P





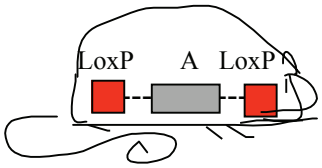
DNA alvo



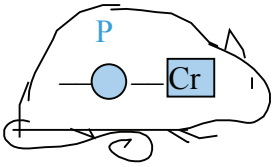
4) As recombinações do tipo I de 3) seleccionadas foram gerar ratos nos quais:

5) o locus alvo A é flanqueado por locais Lox P.
Estes ratos podem ser cruzados com ratos transgénicos previamente construídos (vide 6 e seguintes) com outros transgenes

6)

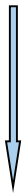


X

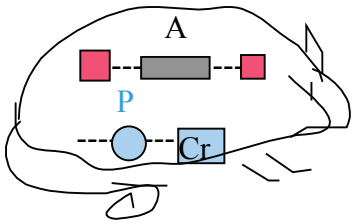


Rato com o locus alvo A
flanqueado por locais Lox P

Rato transgénico com o gene Cre ligado
a um promotor ---(P)----específico de um
tipo de célula

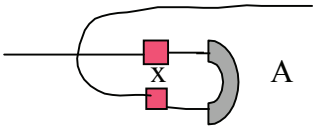


7)



Expressão do gene Cre específica do promotor P da célula ou tecido

8)



delecção específica do tecido ou célula do gene A no locus

Em 6) da figura anterior o rato transgénico representado à direita é portador de uma construção integrada que contem o gene de uma recombinase Cre ligada a um promotor P específico de um dado tecido. O rato representado à esquerda em 6) é o rato obtido em 4 e 5.

Em 7) a descendência que contenha o locus alvo flanqueado por dois locais Lox P mais o gene Cre, expressará o gene Cre no tipo de tecido correspondente ao promotor utilizado e a recombinação entre locais P (8) nestas células originará a inactivação do locus alvo A apenas nas células ou nos tecidos específicos correspondentes ao promotor P utilizado.

O sistema Lox P/ Cre facilita pois o desenvolvimento condicionado de animais Knockout originando a falha ou inactivação de um determinado gene apenas num dado tecido ou células ou após uma determinada fase do seu desenvolvimento.

Este sistema pode ainda facilitar "in vivo" a activação/inactivação de transgenes, delecção de grandes porções de DNA genómico, translocações cromossomais e subtis alterações de genes ou das suas sequências reguladoras "in vivo".

A utilização de vectores com mutantes Lox P para reciclar marcadores seleccionados e condicionar Knockouts (Arakawa, H. et al.i, 2001)

Como temos vindo a referir a rotura de genes, pode ser feita pela integração de genes alvejados ("targeted") de construcções transfectadas.

Há linhas celulares especialmente indicadas para modelos de knockout em virtude da alta actividade de integração em locais alvo.

No entanto a rotura de diversos genes e dos seus respectivos fenótipos depara muitas vezes com a dificuldade de se possuir um número limitado de genes marcadores utilizáveis para as construções, sendo pois altamente desejável reciclar os marcadores seleccionáveis, utilizando um sistema de recombinação sítio-específico para o local, com é o caso do Cre/Lox P.

Muitos plasmideos vectores são construídos com marcadores seleccionados flanqueados por dois mutantes diferentes Lox P "sites". Após a transfecção estável, os genes marcadores podem ser excisados do genoma, pela indução transitória da expressão de uma Cre-recombinase. Esta excisão converte as duas mutantes Lox P "sites" numa dupla mutante Lox P inactiva

Podem ser construídos vectores contendo cassetes de expressão de cDNA entre as mutantes Lox P "sites".

Estes vectores podem ser utilizados para o desenho de construções para knockout.

O sistema de recombinação Cre-Lox P tem sido utilizado para a manipulação genética de células eucariotas de animais superiores.

Como referimos anteriormente a Cre recombinase standard reconhece sequências sinal de recombinação Cre de 34 pares de bases, chamadas Lox P e pode promover a delecção de genes que sejam flanqueados por dois Lox P "sites" na mesma direcção.

Há contudo um sistema mutante Lox P que é composto por dois mutantes diferentes de LoxP "sites", o Lox P – RE e o Lox P- LE que têm sequências palindromas mutadas em 5 bp em vez das 13 bp do Lox P "site" standard.

A Cre recombinase reconhece também estas mutantes Lox P "sites" e delectam as regiões intervenientes, e durante este processo as mutantes lox P-RE e Lox P -LE são convertidas num novo Lox P-RE+LE "site", que é pobremente reconhecido pela Cre.

Sítios de recombinase Lox P podem ser obtidos pela transfecção transitória com um plasmideo de expressão Cre.

É possível construir plasmideos vectores contendo cassetes de marcadores seleccionados flanqueados por mutantes de Lox P "sites". Após integração no genoma estas cassetes de marcadores podem ser eficientemente deletadas.

É possível também construir vectores contendo cassetes de cDNA que se exprimem, flanqueadas por Lox P "sites", utilizáveis para promover knockouts.

Muitas vezes os genes dos marcadores seleccionados, encontram-se nas construções entre Lox P-RE e Lex P-LE, e são activados por um promotor de B-actina de frango, sendo a transcrição desses marcadores seleccionados terminada por um sinal poli A.

As construções para Knockout são geralmente desenhadas contendo sequências clonadas da extremidade 5' e 3' do locus "target" activado pelo promotor B- actina de frango, dentro de múltiplos pontos de clonagem, podendo existir diversas estratégias para este efeito.

Todos os genes dos vectores podem ser activados pelo promotor B-actina de frango que é um promotor forte nas células mamíferas, ou por outro tipo de promotores.

1.6 - Substituição de genes e animais transgénicos Marcadores positivos e negativos (Lodish, et all., 2000,chap 8.5.)

A construção de animais com determinados genes escolhidos modificados (por knockout) ou de animais trangénicos, utiliza metodologias em que "in vitro" esses genes clonados (similares aos genes escolhidos) são mutados e depois transferidos para células encariotas.

Para isto determinadas sequências desses genes clonados são alterados "in vitro" e depois introduzidos em animais experimentais. As metodologias químicas e enzimáticas utilizáveis para este efeito são variadas, permitindo algumas delas mutações específicas num determinado local da molécula de DNA.

Hoje é possível sintetizar quimicamente oligonucleotidos com a sequência desejada, como agentes para essas mutações, introduzindo neles modificações químicas adequadas. A sua utilização permitirá com elevada precisão originar delecções, inserções ou mutações pontuais nas sequências de DNA, após a transferência deste para células eucariotas (das quais existem diversos tipos para este finalidade)quando mantidas em meios de cultura adequados e com manipulações bem conduzidas.

As células mamíferas em meios de cultura próprios podem tomar o DNA exógeno preparado e construído de acordo com os objectivos apropriados, de diversas formas já referidas por exemplo por electroporação (choque eléctrico breve de milhares de volts) ou por tratamentos químicos e físicos diversos.

Uma vez entrado esse DNA estranho nas células hospedeiras as próprias enzimas celulares que funcionam normalmente na síntese e reparação eventual do DNA juntam os fragmentos de DNA estranho, aos cromossomas da célula hospedeira, mas como isto sucede apenas num pequeníssimo número dessas células, é necessário que o DNA estranho veicule também um marcador (por exemplo resistência a determinado antibiótico, ou capacidade de utilização de determinada substância) que permita a identificação dessas células.

O DNA estranho pode ser inserido no genoma hospedeiro de formas muito variadas, assim pode substituir um gene endógeno análogo, por recombinação homóloga, ou pode não se inserir num determinado local preciso, ou pode mesmo permanecer numa forma independente dos cromossomas de células (como uma molécula de DNA extracromossomal ou episoma).

Com a técnica do knockout podem substituir-se genes normais por alelos mutados num organismo normal. Para se conseguir isto no caso dos ratinhos, em linhas gerais actua-se da seguinte forma: (Lodish, et all., idem)

- a) Os alelos mutados "in vitro" são introduzidos por transfecção e recombinação homóloga em células estaminais embriónicas (ES) cultivadas.
- b) As células que contêm a mutação desejada são introduzidas em embriões de ratinho em início de formação produzindo ratinhos quiméricos.
- c) Os ratinhos quiméricos são cruzados para obter linhas germinativas que contenham a mutação introduzida.
- d) Os ratinhos heterozigóticos, são cruzados para obter ratinhos homozigóticos para a mutação.

Na etapa – a) anterior o DNA introduzido nas celulas recombina-se com as sequências cromossomais num pequeno número de células (cerca de 1%).

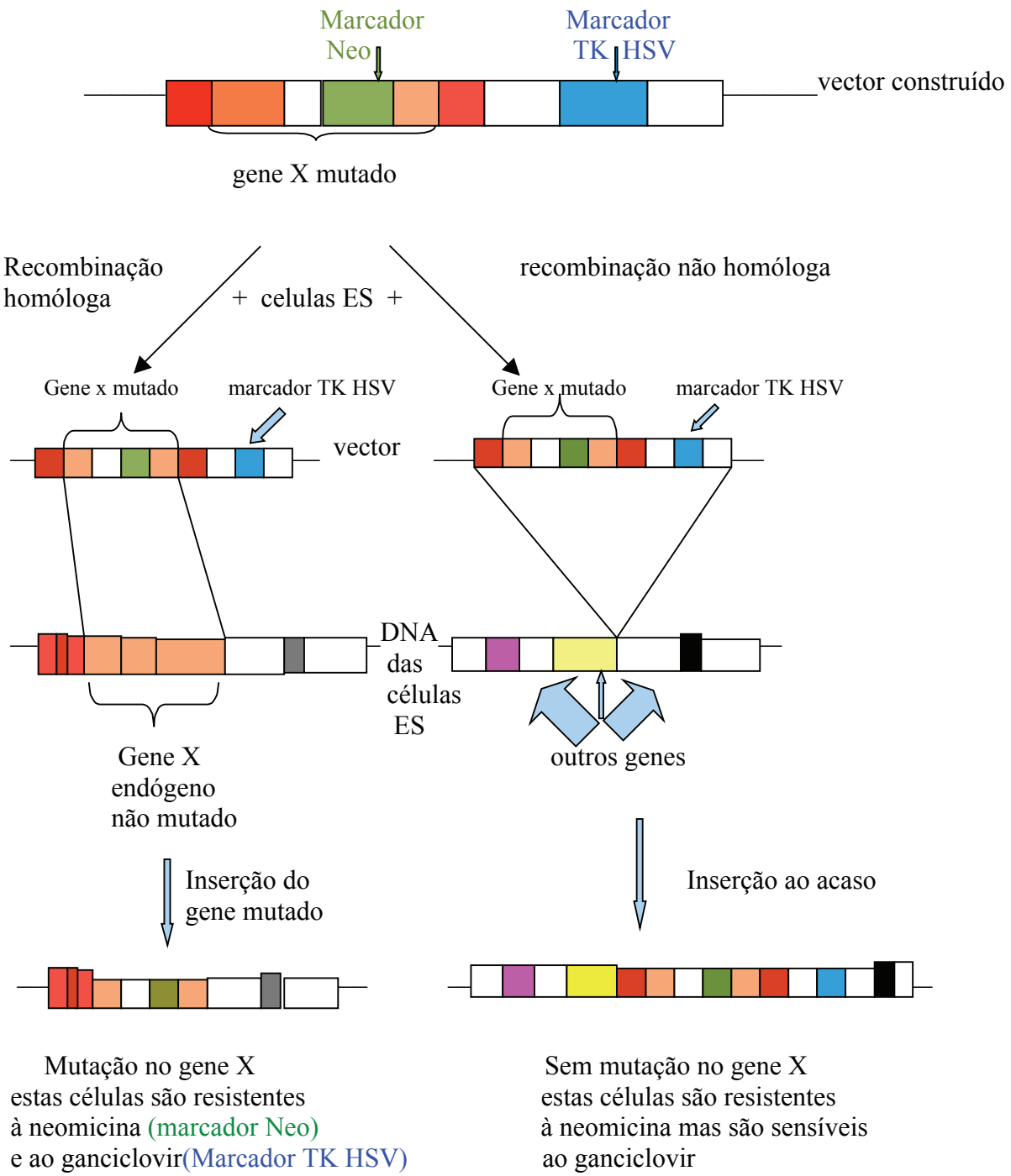
Em algumas células, este DNA introduzido recombina-se com locais homólogos dos cromossomas celulares (recombinação homóloga) mas é muito mais frequente (cerca de 10^3-10^4 vezes), a recombinação noutros locais dos cromossomas (recombinação não-homóloga).

É preciso pois em todas estas populações celulares dispor de meios (marcadores) que identifiquem positivamente ou negativamente a recombinação homóloga. Assim a selecção positiva identifica as células nas quais ocorreu qualquer recombinação, e a selecção negativa remove as células nas quais a recombinação ocorreu em locais não-homólogos.

Para se conseguir esta selecção o DNA exógeno a introduzir nas células é construído com a inclusão das sequências para proceder ao knockout do gene endógeno seleccionado e ainda com genes de dois marcadores seleccionadores, tal como se indica na figura 9 seguinte:

Figura 9
Isolamento de células ES através de selecção positiva
e negativa, para identificação daquelas em que ocorreu gene targeting
(knockout de um determinado gene)
(adaptado de Lodish et all. 2000-8.5 – Gene replacement and transgenic animals)

1) Construção de células ES com a mutação
(knockout)

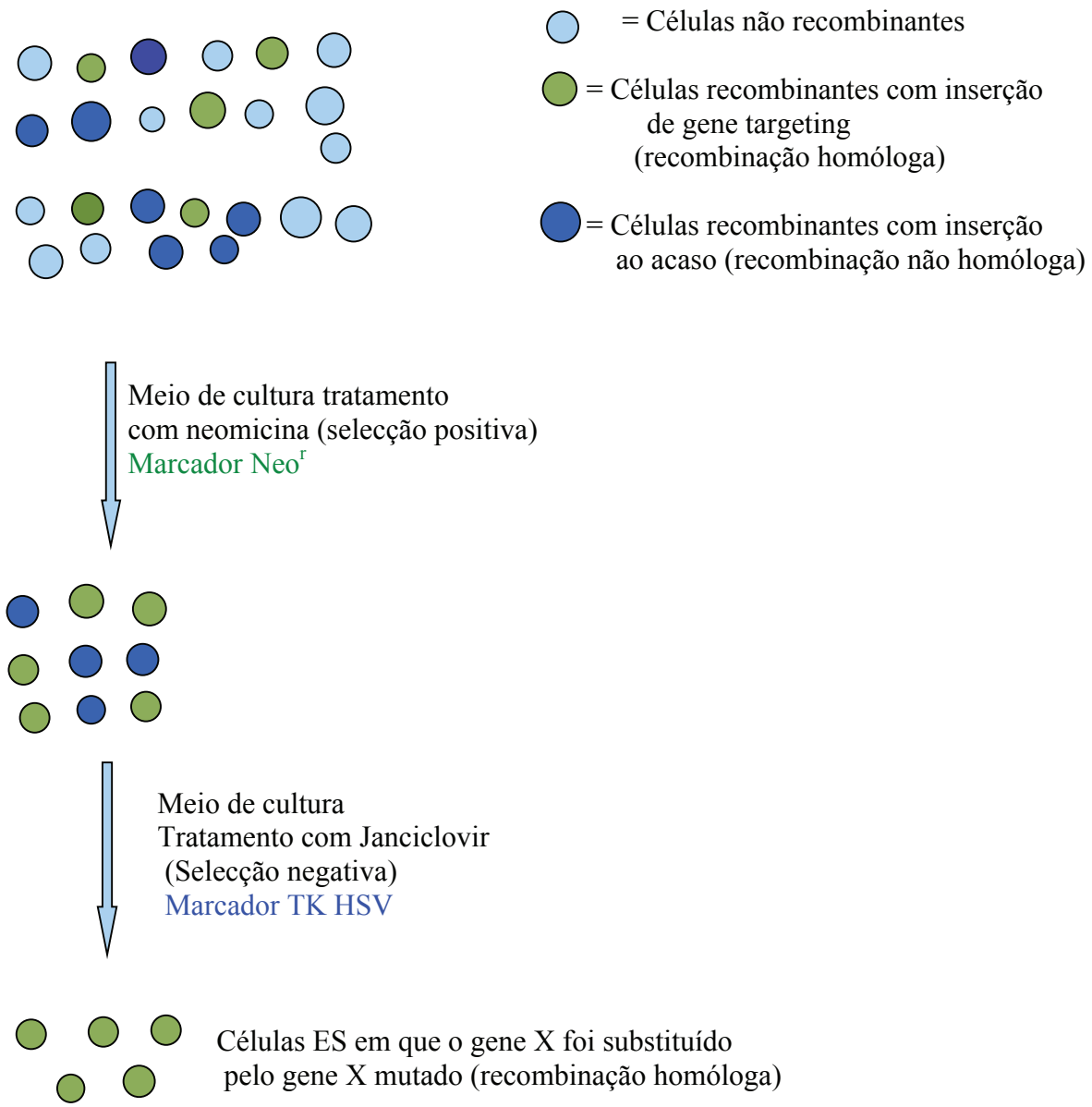


Salienta-se que na construção do vector se inseriu a sequência do marcador Neo dentro das sequências em que havia homologia, enquanto o marcador TK HSV se situava fora das sequências compreendidas entre aquelas em que havia homologia.

Assim, aquando da recombinação homóloga apenas as sequências compreendidas dentro das zonas homólogas, eram inseridas no DNA cromossomal das células (as sequências fora das sequências compreendidas entre as zonas homólogas eram catabolizadas) enquanto na recombinação não-homóloga a totalidade do vector era inserida no DNA cromossomal das células e daí a presença nestas de marcador TK HSV.

Portanto quando as células, no nosso exemplo as ES, eram cultivadas em meio que continha neomicina, o marcador Neo^r veiculado pelo vector dava-lhes resistência para se multiplicarem neste meio de cultura, excepto as células em que o vector não era incorporado, essas morriam (selecção positiva), vide figura 10 seguinte.

Figura 10
Selecção positiva e negativa das células ES recombinantes
(adaptado de Lodish et all. 2000-8.5 – Gene replacement and transgenic animals)



As células que se multiplicavam e sobreviviam neste primeiro ensaio eram depois cultivadas num meio de cultura ganciclovir que continha um análogo citotoxico da Timidina. Este utilizado pelas células que continham a enzima (TK HSV), enzima especial que (ao contrário da enzima endógena correspondente das células ES) incorporava com efeitos nefastos esse nucleotido análogo, o ganciclovir, quando da síntese do DNA durante a replicação celular e permitia apenas a sobrevivência das células que não tinham esse marcador TK HSV e portanto não incorporavam o nucleotido análogo nefasto (é o caso das células com recombinação homóloga), Vide figura 10.

Obtidas celulas ES heterozigóticas com uma mutação knockout num determinado gene, são elas injectadas num blastocisto o qual é depois transferido para uma fêmea de aluguer pseudo-grávida tal como se referiu anteriormente em -a), -b), -c), e -d).

Como já referimos os genes podem ser modificados "in vitro" por diversos métodos enzimáticos e químicos e depois incorporados até as linhas germinativas na sua localização original, através de recombinação homóloga produzindo knockout, ou localizados em diferentes locais através da recombinação não-homóloga, produzindo transgénicos.

È também possível realizar o knockout de um determinado gene num tecido ou numa célula escolhida.

1.7 – Recombinação
(Wikipedia, Genetic recombination)

Em biologia molecular recombinação refere-se a um processo molecular no qual alelos de dois genes num grupo de "linkage" podem ficar separados, ou seja, em que a combinação de genes numa célula ou num organismo difere da sua descendência.

Um mecanismo que leva à recombinação é o crossing over cromossomal.

Da mesma forma é possível troca de alelos entre locais homólogos dentro de uma molécula de DNA.

Se a estrutura dos genes é alterada neste processo diz-se que é uma recombinação não balanceada que é rara em relação ás recombinações normais.

As recombinases são as enzimas que catalizam estas reacções.

Durante a meiose ocorre o crossing over de dois cromossomas.

O crossover cromossomal ocorre entre dois cromossomas emparelhados durante a profase I da meiose, permutando alguma porção distal do seu DNA, podendo ocorrer entre cromossomas homólogos, quando se cindem e tornam a unir mas com diferentes peças terminais.

A recombinação crossover pode ocorrer entre duas duplas hélices de DNA que tenham sequências muito semelhantes e entrem em contacto uma com a outra. Assim podem ocorrer crossover por exemplo entre repetições Alu dentro do mesmo cromatideo ou entre sequências similares de dois cromossomas completamente diferentes.

Existem outros tipos de recombinações, por exemplo recombinação sítio-específico conservado, em que um elemento móvel de DNA se insere numa hélice de DNA de forma semelhante ao crossover, através de enzimas chamadas integrases.

Na recombinação por transposição ou outra forma de recombinação sítio-específico, as integrases recombinam o elemento móvel para interactuar com o DNA alvo não necessitando de hélices idênticas no DNA.

Recombinação homóloga (knockout) e recombinação não-homóloga (Homologous recombinations & Knockout Mouse)

Recombinação homóloga

Para operar a substituição de um alelo por outro construído, sem afectar outros locus do genoma, utiliza-se a recombinação homóloga ou mais simplesmente a recombinação.

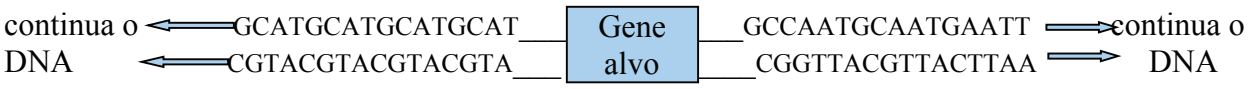
Para isto é necessário conhecer a sequência do DNA do gene que se pretende substituir.

De posse deste conhecimento é possível substituir qualquer gene por um construído a nosso gosto.

Vamos utilizar dois exemplos para apreciarmos em detalhe a recombinação homóloga (Figuras 11, 12, 13 e 14) e a não-homóloga.

figura11

1º – Esquema do gene a ser modificado

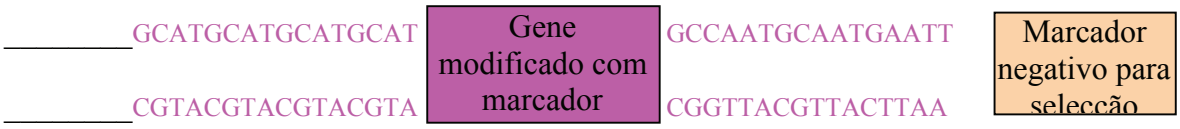


A sequência codificadora da proteína expressa é a contida na caixa Gene e é essa que vai ser substituida por outra modificada construída "in vitro". Salienta-se que esta sequência alvo é flanqueada acima e abaixo ou seja à sua esquerda e à direita pelas sequências indicadas pelas abreviaturas.

2º – Construção do gene modificado

Esta construção pode conter diversos alelos (funcionais uns e não funcionais outros se assim se pretender), diversos genes ou genes marcadores (por exemplo de resistência a certos antibióticos, etc). Além destas inserções a construção pode incluir ainda algum DNA flanqueador (idêntico aquele que flanqueou o gene alvo em 1º) de um e de outro lado da construção.

figura 12

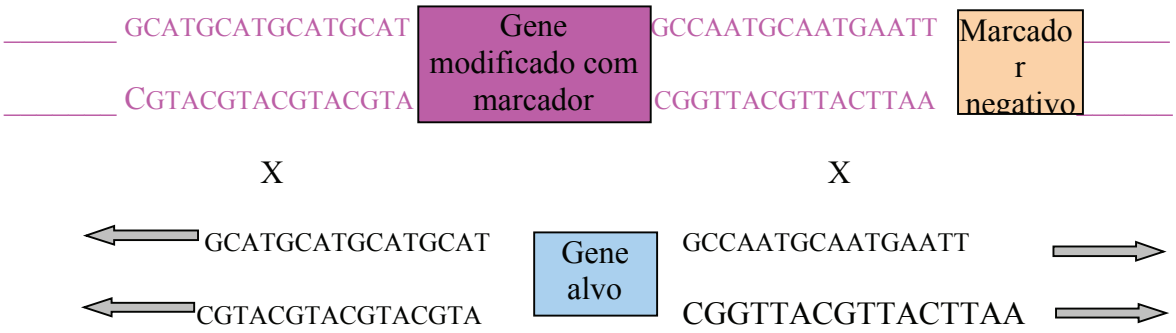


Salienta-se que as sequências acima e abaixo à esquerda e à direita do gene modificado são idênticas ás que se encontraram em 1º , e que o marcador positivo se situa entre estas sequências, e o marcador negativo situa-se à direita, fora das sequências similares.

3º – Alinhamento do DNA construído "in vitro" com o DNA alvo contido nas células alvo

A construção "in vitro"de DNA é adicionada ás células que contêm o DNA alvo que nos interessa, e durante a divisão celular quando os cromossomas homólogos se alinham no plano metafásico o DNA construído encontra o gene alvo e a recombinação ocorre dentro das sequências homólogas idênticas.

figura 13



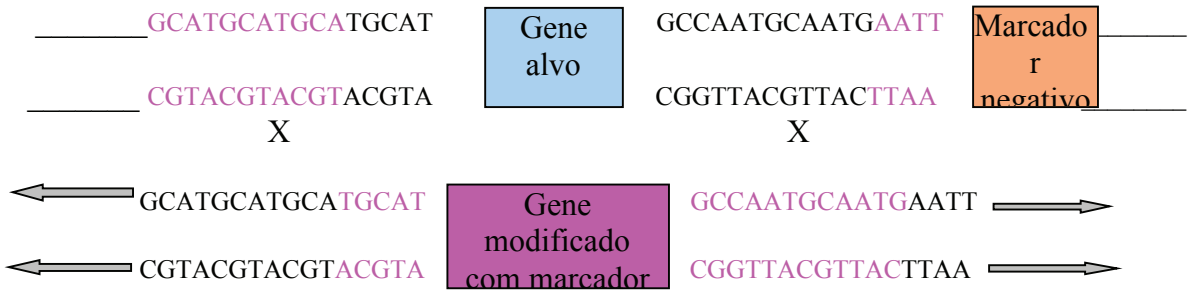
A recombinação pode ocorrer em qualquer local dentro das sequências flanqueadoras dos genes alvo e modificado. (vide diagrama seguinte)

Uma vez feita a recombinação no interior das células a nova peça de DNA fica inserida num cromossoma da célula.

Um único locus foi substituído pela construção mutada e por algum do DNA flanqueador do gene mutado permanecendo o resto do genoma inalterado podendo o cromossoma modificado replicar-se francamente nas células em divisão.

4º – Produtos finais da recombinação homóloga

figura 14



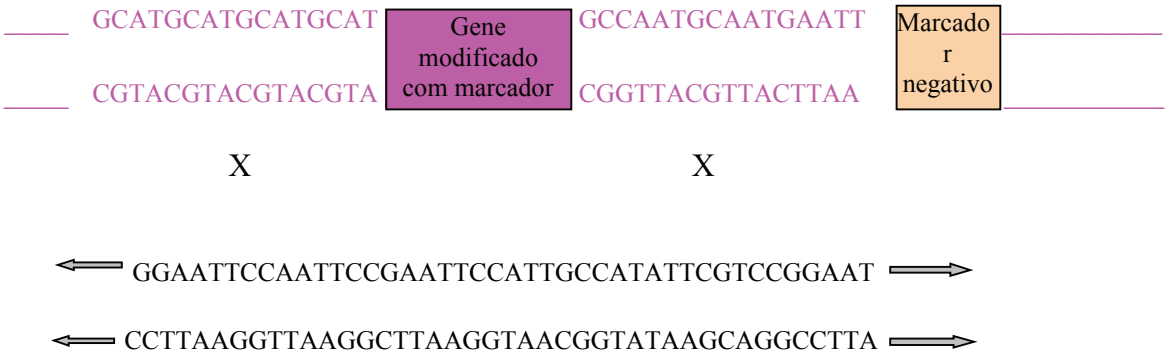
O cromossoma (⇐ ⇒ / ⇐ ⇒) contem agora uma parte das duas sequências flanqueadoras assim como o gene modificado contendo um marcador positivo que substituiram o alelo alvo inicial. Este, o alelo alvo inicial recombina-se com parte da construção e depois é catabolizado pela célula.

Recombinação não-homóloga

Se o vector ou seja a construção anteriormente referida se alinha com uma região não-homóloga do genoma celular a recombinação ocorre ao acaso e o marcador negativo é incorporado no genoma tal como se representa seguidamente.

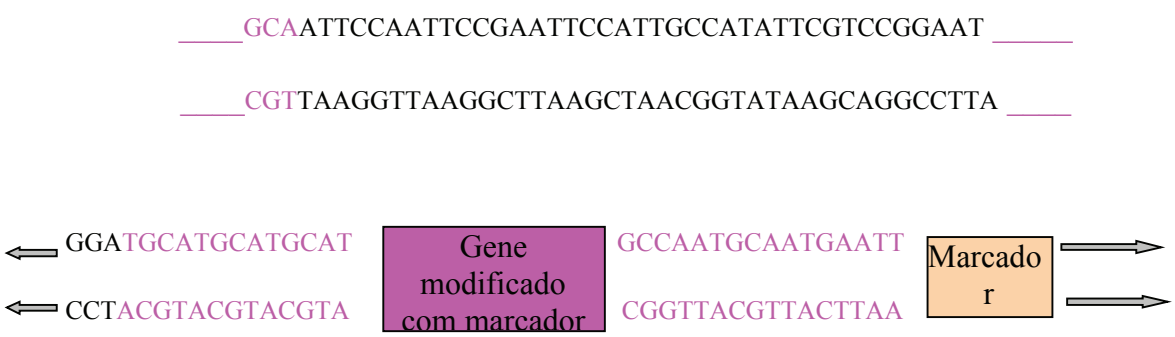
Alinhamento não-homólogo

figura 15



Produtos finais da recombinação não homóloga

figura 16



Estes produtos finais da recombinação não-homóloga permitem que estas células onde existem sobrevivam à presença de um dado antibiótico no meio de cultura (dado possuírem um marcador positivo para esse efeito) mas em multiplicações subsequentes num outro meio de cultura com um substrato utilizável pelo marcador negativo, não metabolizando portanto o substrato do meio de cultura apenas as células que não contêm este último marcador sobrevivem como é o caso das células em que ocorreu recombinação homóloga.

1.8 - Obtenção de animais "knockout"

A obtenção de um animal com um gene knockout implica que ambos os alelos desse gene sejam substituídos por um alelo inactivo, o que pode ser alcançado através das etapas referidas seguidamente servindo-nos por exemplo de ratinhos e utilizando a recombinação homóloga para substituir um alelo, seguindo-se depois cruzamento selectivo com duas ou mais gerações até isolar animais com ambos os alelos com genes inactivados ou knockout.

1ª etapa – Isolar de um animal com determinadas características (por exemplo ratinhos de pelagem cinzenta) um embrião no estadio de blastocisto.

2ª etapa – Remover células estaminais embriónicas destes blastocistos e cultivá-las em meio de cultura adequado.

3ª etapa – A sequência nucleotídica da construção contendo o gene mutado desejado é transfeccionada para estas células estaminais da 2ª etapa seleccionando depois aquelas células em que ocorrer a recombinação homóloga (vide recombinação homóloga e não-homóloga).

4ª etapa – Recolher da cultura as células seleccionadas onde ocorreu a recombinação homóloga e injectá-las num novo blastocisto de um animal com características diferentes das do animal da 1ª etapa (por exemplo ratinho de pelagem branca).

5ª etapa – Estes últimos blastocistos injectados, constituem quimeras, sendo depois inoculados numa fêmea pseudo grávida com as características das do animal da 4ª etapa e a gestação levada até ao seu termo.

6ª etapa – Dos animais nascidos alguns ratinhos serão brancos normais e outros quimeras. Dos ratinhos que são quimeras alguns derivam de células estaminais recombinantes que produzem manchas cinzentas nos animais, facilmente identificáveis.

7ª etapa – Cruzar estes ratinhos quiméricos com manchas cinzentas com ratinhos brancos normais. Será possível obter descendência de pelagem cinzenta de animais heterozigótos de recombinação homóloga.

8ª etapa – Cruzar os heterozigotos cinzentos (+/H) e genotipar a descendência cinzenta. Identificar os recombinantes homozigotos (H/H) e cruzá-los para obter uma linha de ratinhos em que ambos os alelos foram knockout.

Como teremos oportunidade de ver mais adiante (em clonagem e transgenese) é possível, através de outras metodologias diferentes da que acabamos de referir, obter em bovinos a inactivação nos mesmos cromossomas de dois alelos de um mesmo gene que não se exprime em condições normais, estando portanto silenciado (como por exemplo o gene da imunoglobulina – _ ou seja o gene IGHM) e de dois outros alelos de outro gene que se exprime em condições normais (como por exemplo o gene PRNP exprimindo a proteína priónica).

1.9 - Manipulação genética de animais para fins experimentais

Através da manipulação genética dos animais pretende-se alcançar diversos objectivos que temos vindo a abordar ao longo destes textos.

Um desses objectivos, e não menos importante, é o de reproduzir nos animais, modelos experimentais de doenças várias muito importantes, com fundo genético que afectam os seres humanos e não só.

Compreende-se neste contexto que é essencial para que se possam produzir estes animais experimentais, conhecer diversas circunstâncias que passamos a referir.

1) Saber aquilo que caracteriza num dado ser vivo um determinado processo patológico.

2) Conhecer a forma ou as formas moleculares através das quais se exprime esse processo patológico e identificá-las na sua estrutura bioquímica e biofísica o mais detalhadamente possível.

3) Identificar ao nível do genoma quais são as sequências responsáveis pela expressão das formas moleculares referidas em 2).

4) Como se depreende qualquer uma das anteriores alíneas necessitam de profundos e extensos estudos que passam inclusivamente pelas bases de dados existentes sobre os diversíssimos tipos de proteínas conhecidas e pelos genomas já sequenciados parcialmente ou na totalidade.

Para este efeito torna-se necessário conhecer a estrutura primária precisa das proteínas envolvidas no processo patológico e através destas deduzir os RNA mensageiros que lhe correspondem e as sequências do DNA a partir das quais eles são transcritos e regulados (há sempre o problema dos intrões que interligam os exões codificadores dessas proteínas não serem conhecidos).

Como se infere isto são tarefas ciclópicas apenas realizáveis em centros de investigação desenvolvidos.

5) Depois é preciso inferir como as sequências de DNA funcionam no desenrolar de todo o processo patológico em causa, e é nessa fase que é necessário criar os modelos animais experimentais.

6) Para isto são necessários animais cujos fenótipos, fisiológicos, sequências genómicas, etc,etc, sejam bem conhecidos pelos investigadores, como é o caso sobretudo do ratinho e da ratazana, animais cujos genomas foram sequênciados completamente para que fossem possíveis estudos desta natureza.

7) Torna-se agora necessário averiguar dentro das sequências de DNA endógeno dos animais a utilizar para fins experimentais, se eles possuem sequências homólogas, análogas das do gene ou genes responsáveis pelo processo patológico referido em 1).

Aqui aflora como extraordinariamente importante os estudos feitos ao longo dos tempos, como por exemplo se o processo patológico de 1) é um processo monogénico ou poligénico, isto é, se está envolvido nele um gene ou diversos genes.

São conhecidos muitos processos patológicos monogénicos mas muitos outros existem poligénicos.

A talho de foice diga-se que as produções animais das espécies pecuárias são processos poligénicos o que condiciona extraordinariamente a sua manipulação genética para melhoria das suas produções.

8) No entanto de uma maneira geral, é necessário construir animais experimentais, em que se promove a modificação no seu genoma (alguns animais experimentais resultam de mutações espontâneas, vide adiante) introduzindo e/ou manipulando o gene responsável pelo processo patológico que se pretende estudar.

Pode ser preciso pois construir "in vitro" um DNA exógeno que contenha as sequências implicadas na sua expressão e regulação, DNA exógeno esse que espelha o gene endógeno identificado e caracterizado na situação patológica em estudo, e depois inseri-lo através das biotecnologias disponíveis em celulas adequadas que gerem depois animais viáveis para efeitos de estudo mais profundo de todo o processo patológico.

Muitos genes têm sido identificados através das propriedades bioquímicas das proteínas por eles expressas ou pela semelhança da estrutura primária da proteína expressa com outras proteínas cuja estrutura primária é conhecida e que se encontra inscrita e anotada em bases de dados de centros internacionais prestigiados.

Induzindo mutações num determinado gene "in vitro" e depois introduzindo essa mutante no genoma de uma célula ou de um animal, para substituir a cópia normal desse gene nesse genoma, podem os investigadores averiguar depois "in vivo" como as coisas se passam. Isto constitui a base do knockout dos genes.

Repetimos esta manipulação para substituir um gene normal por um gene mutado num dado ser vivo, estará muito simplificada se se conhecer a sequência genómica completa desses genes vivos.

Em quaisquer circunstâncias a manipulação pode seguir as seguintes etapas:

1ª – No caso da sequência do genoma ser conhecida,

A- "Isolamento" do gene pretendido
B- Zona ou local do DNA genómico em que se situa esse gene.
C- Construção de uma mutante desse gene

2ª – No caso da estrutura primária da proteína ser conhecida,

A- Isolamento da proteína e respectiva sequência
B- Síntese de um oligonucleotido correspondente a essa proteína ou seja ao gene em causa
C- Localização desse gene no DNA
D- Construção de uma mutante desse gene (neste caso corre-se sempre o risco dos intrões desse gene não figurarem na mutante construída do gene).

Como vimos existem diversas técnicas para introduzir genes estranhos ou modificados num gene endógeno de um animal, mas na maioria dos casos não é substituído o gene endógeno, mas ocorre sim a integração de mais cópias do gene estranho (transgenes) sendo os animais seus portadores transgénicos.

2 - Outros exemplos de manipulações genéticas dos animais

2.1 - Obtenção de animais experimentais

Alguns animais surgem espontâneamente como modelos de certas doenças humanas.

Outros animais são produzidos artificialmente para este efeito através de diversas metodologias transgénicas e de gene "targeting".

Animais experimentais como modelos de diversas doenças
(Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 21.4)

A "construção" de animais experimentais que possam servir como modelos de determinadas doenças sobretudo humanas, pode ser conseguida com tecnologias transgénicas e com tecnologias de gene "targeting".

A obtenção destes modelos animais permite estudar em grande detalhe as bases fisiológicas envolvidas na doença do modelo, bem como averiguar da eficácia de novos tratamentos entretanto descobertos.

No entanto alguns animais experimentais utilizados como modelo para estudo de doenças humanas, surgiram espontaneamente, enquanto outros foram construídos artificialmente através de diversas metodologias.

Até há pouco tempo a maioria destes animais modelos experimentais resultavam de mutações espontâneas (vide quadro 4 seguinte) ou eram induzidas essas mutações por altas doses de produtos químicos mutagénicos ou por raios X, que geram contudo mutações ao acaso.

Hoje as tecnologias por transgenese e gene "targeting" sobretudo em ratinhos, têm permitido ir muito mais além (vide quadro 5 seguinte) pois possibilitam promover a alteração desejada num gene alvo escolhido.

Quadro 4

Exemplos de animais modelos experimentais, resultantes de mutações espontaneas
(adaptado de Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 21.2)

Mutante animal	Aspectos fenotípicos e patogénese molecular
Ratinho NOD	Diabetico, não obeso, imitando a diabetes mellitus humana dependente da insulina
Ratinho mdx	Distropia muscular ligada a X (mutação no gene distrofina do ratinho)
Cão hemofílico	Homólogo da hemofilia B humana (mutação missense no gene do factor IX canino)
Coelho WHHL (Watanable heritable hyperlipidemic)	O homólogo humano é a hipercolesterolémia [delecção de quatro codões do gene receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR)]
Suínos ateroescleroticos	Hipercolesterotemia marcada
Ratinho Splotch	Pigmentação anormal
NF damselfish	Homólogo da neurofi-bromatose humana do tipo I

Quadro 5

Modelos de doenças humanas em animais experimentais obtidos por transgenese ou por gene targeting
(adaptado de Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 21.3)

Doença humana ou fenótipo anormal	Gene	Método para construção de modelo animal
– Fibrose quística	CFTR	Inactivação por inserção do gene targeting
– B- talassemia	HBB (B globina)	Idem
– Hipercolesterolemia e ateroesclerose	Genes da apoliproproteína, por ex: APOE	Idem
– Doença de Gaucher		Idem
– Síndroma frágil X	FM RI	Idem
– Gene da proteína de Gerstmann – Straussler-Scheinker (GSS) com síndroma de mutação missense	Gene da proteína priónica (PRNP)	Idem
– Ataxia spinocerebelar do tipo I (SCA 1)	SCA 1 (ataxina)	Integração do gene mutante da ataxina humana com repetições do tripleto expandido
– Doença de Alzheimer	APP (proteína percursora B-amiloide)	Integração da mutante APP cDNA em todo o comprimento sob o controle de um promotor derivado do factor de crescimento derivado das plaquetas

Os animais potencialmente utilizáveis como modelos de doenças humanas vão desde os primatas aos ratinhos, ratazanas, zebrafish, ovinos e suínos, cada um deles com características próprias diferentes, sendo uns mais adequados para determinadas doenças do que outros. Por ex: para estudos de fibrose quística humana, os ovinos experimentais parecem ser melhor do que os ratinhos.

Além das objecções de natureza social levantada à utilização de animais experimentais, há no entanto algumas espécies animais mais aceites pela opinião pública em geral.

Por outro lado a possibilidade da existência de zonas ortologas ou sejam homólogas nas regiões subcromossomais humanas (entre as doenças humanas que se pretendem reproduzir) com os animais experimentais, assumem grande importância.

A forma mais simples para criar um modelo de animal para determinada doença em que esteja envolvido um simples gene, é construir um ratinho knockout para este gene. É necessário primeiro isolar o gene ortologo do ratinho e utilizar um segmento dele para operar o knockout do gene endógeno em celulas ES do ratinho utilizando a metodologia do gene "targeting" atrás esboçada.
Como referimos segue-se a injecção destas celulas ES modificadas num blastocisto de uma mãe de aluguer e depois continua o desenvolvimento e as ninhadas geradas com a mutação desejada nas suas linhas germinativas são cruzadas e rastreadas para assinalar a presença da mutação imprimida.

Normalmente o objectivo consiste em obter a completa ausência da expressão desse gene (null allele) mas por vezes o alelo mutante retem ainda alguma expressão.

A modelagem de doenças complexas como a ateroesclerose, hipertensão essencial, diabetes, etc (doenças poligénicas) é muito difícil necessitando-se no futuro da construção de modelos mais adequados que os actuais. Muitos modelos de doenças humanas são difíceis de construir no ratinho dada a diversidade das vias bioquímicas e do fundo genético dos humanos para os animais.

2.2 - Geneterapia em animais

A geneterapia e outros meios terapêuticos moleculares são novos meios para tratamento de doenças baseados na genética.

A maioria das doenças humanas e admite-se que o mesmo sucede nos animais, são doenças poligénicas nas quais se incluem doenças cardio-vasculares, asma, cancro, diabetes, artrite reumatoide, obesidade, alcoolismo e esquizofrenia, etc,etc, envolvendo portanto cada uma delas, multiplos genes, efeitos ambientais e respectivas interacções.

Tudo isto são matérias em profundo estudo para aplicação em seres humanos e que passam inclusive pela utilização de animais de experiências para este efeito.

A sua utilização concreta para situações de âmbito dos animais de companhia ou das espécies pecuárias é muitíssimo mais incipiente, não se afigurando por ora aplicações utilitárias pelo menos no próximo futuro, o que não significa que se deixem de abordar alguns princípios em que se baseiam estas biotecnologias.

Tudo depende da patogénese de cada situação patológica, podendo admitir-se diferentes estratégias para a geneterapia a desenvolver, tal como se esquematiza na figura 17 seguinte (Strachan, T. &

Read,A.P.,1999 – cap. 22.1), em situações um tanto diferenciadas, a referir:

Geneterapia classica

a) Terapia por aumento da expressão de um dado gene.
b) Terapia por indução da morte directa de celulas "doentes".
c) Terapia com morte de células doentes desencadeada através de células imunitárias.

Geneterapia não clássica

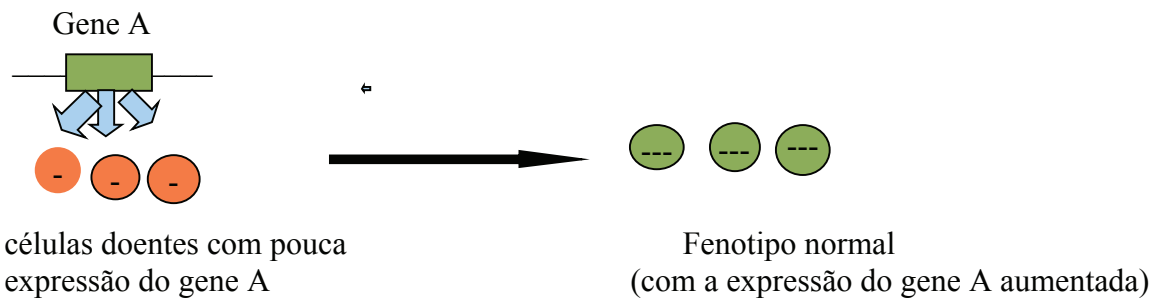
d) Terapia por inibição da expressão de um dado gene.
e) Terapia com correcção da mutação num dado gene.

Experimentam-se neste momento para efeitos terapêuticos, em vez dos métodos tradicionais, novos processos baseados na engenharia genética com a produção de proteínas recombinantes e vacinas geneticamente construídas.

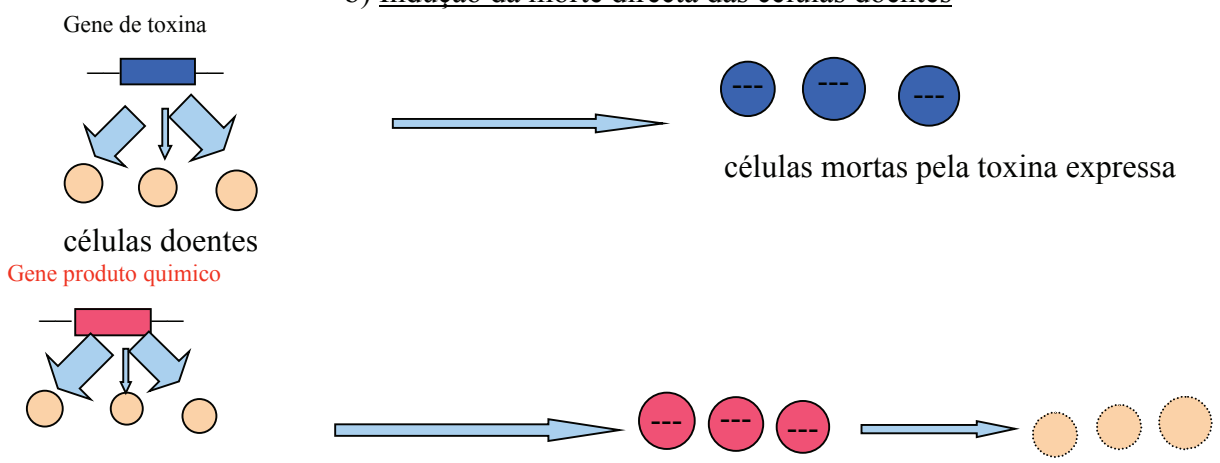
Figura 17

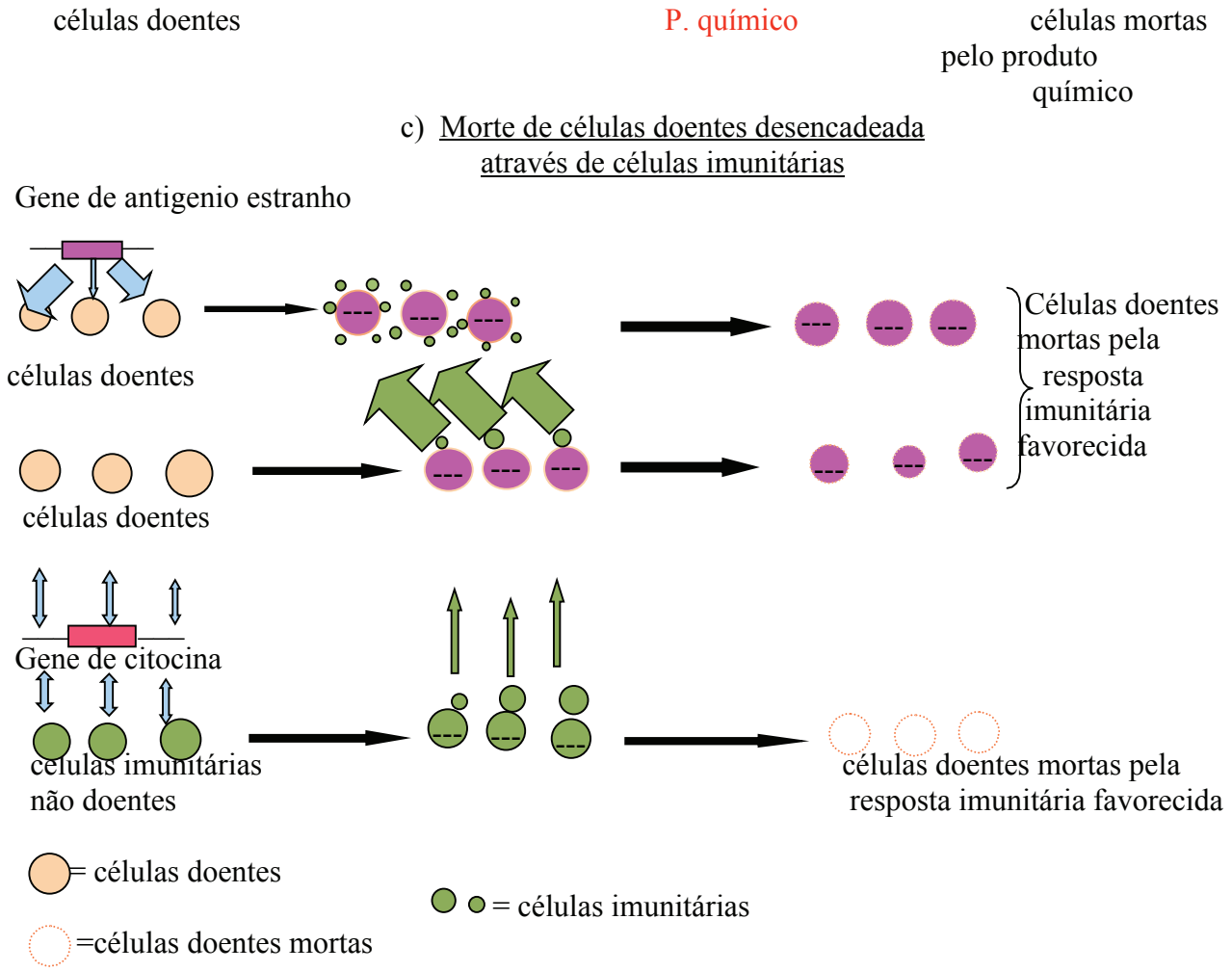
Geneterapia clássica

a)Terapia por um aumento da expressão de um gene
(adaptado de Strachan, T & Read, A.P., 1999 fig. 22.1)



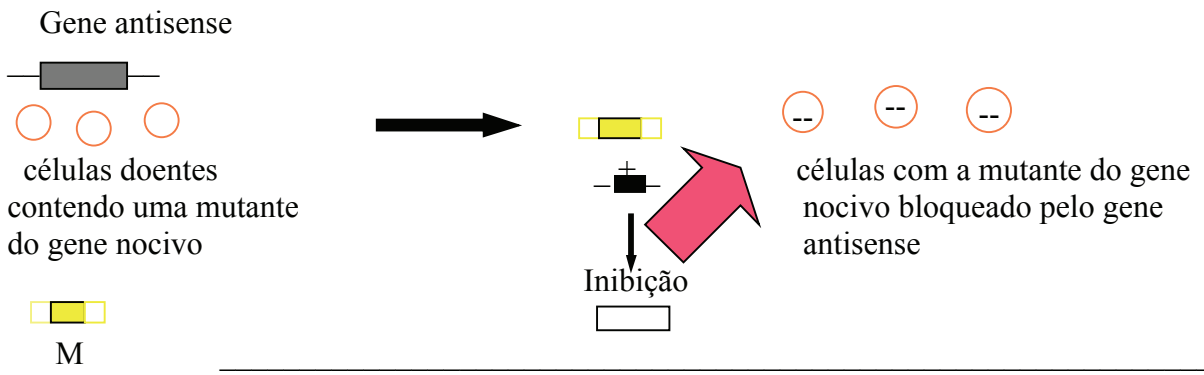
b) Indução da morte directa das células doentes



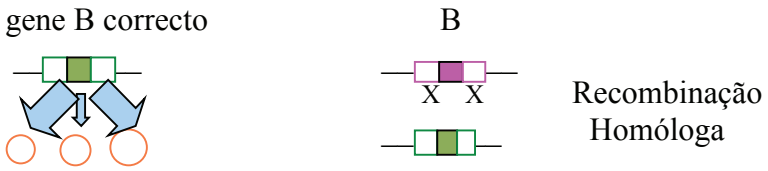


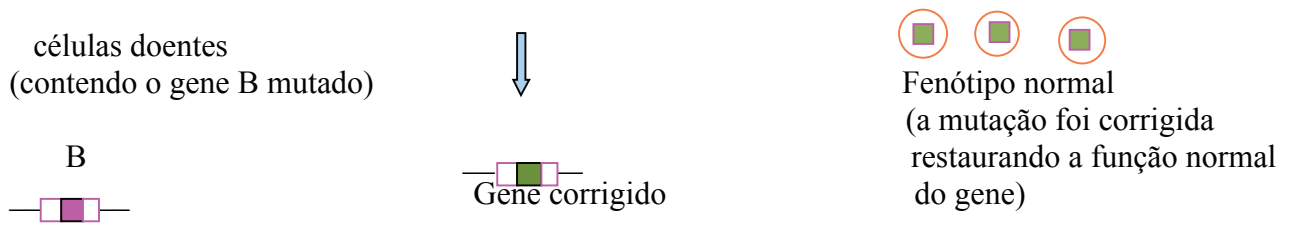
Geneterapia não classica

d)Correcção da expressão num dado gene



e)Correcção da mutação num dado gene





Para esta finalidade induz-se, por exemplo, a expressão de genes normais clonados em microorganismos ou em animais transgénicos (biorreactores, vide quadro 6 seguinte) ou manipulam-se os genes implicados na produção de anticorpos (em ordem a obter novos anticorpos e mesmo anticorpos humanizados, a partir de diversas espécies animais) ou produzem-se vacinas através de etapas de engenharia genética.

A expressão geneterapia envolve a utilização de células do doente, células geneticamente modificadas por incorporação de genes, segmentos de genes ou mesmo oligonucleotidos, directamente nas células do próprio doente (geneterapia "in vivo") ou para células modificadas "in vitro"e depois devolvidas ao doente (geneterapia "ex vivo)(Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.2.1) .

Com estes tratamentos podem vizar-se doenças infecto-contagiosas, cancros, doenças hereditárias, ou doenças imunitárias, através, da geneterapia clássica, da expressão de um produto que não existe no doente, ou matando as células doentes directamente ou activando as células imunitárias, ou na geneterapia não clássica inibindo a expressão de genes ou corrigindo os seus defeitos restaurando a normalidade.

A geneterapia habitual é exclusivamente realizada em células somáticas nos seres humanos dadas as questões éticas envolvidas em processos desta natureza operadas em células das linhas germinativas.

Quadro 6
Produtos farmacêuticos produzidos por clonagem transgénica
(adaptado Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.1)

Produto	Processo patológico em que é aplicado
– factor de coagulação sanguínea VIII	- Hemofilia A
– factor de coagulação sanguínea IX	- Hemofilia B
– Eritropoietina	- anemia
– Insulina	- Diabetes
– Hormona de crescimento	- Deficiências no crescimento
– Activador do plasminogenio tissular	- Desordens trombóticas
– Vacina hepatite B	- Hepatite B
– _ interferão	- Hepatite crónica leucemia celular
– _ interferão	- Esclerosa multipla
– _ interferão	- Infecções em doentes com granulomatose crónica
Interleucina – 2	- Carcinoma celular renal
– Factor estimulador de colónias granulocito (G-CSF)	- Neutropenia post quimioterapia
– Dnase (desoxiribonuclease)	- Fibrose quística

A utilização de microorganismos ou de animais biorreactores para a obtenção destes produtos do quadro 6 anterior depende de diversas circunstâncias e possuem diversas características, embora pareça desenhar-

se uma maior vantagem na utilização dos animais biorreactores transgénicos construídos especialmente para este efeito, dado a tradução e posterior metabolização das proteínas expressas, ser mais vantajosa nos animais, bem como o isolamento, a purificação dos produtos obtidos.

As células animais são vantajosas relativamente ás células microbianas para efeito da produção de proteínas recombinantes ou sejam os animais transgénicos biorreactores.

No caso das proteínas recombinantes segregadas pelos animais através do leite, o transgene é construído contendo um promotor mamário específico, como pode ser o caso do gene da caseína.

No quadro 7 seguinte (Primrose, S.B. et ali., 2001, table 14.4) referem-se uma série de proteínas recombinantes produzidas nas secreções de animais biorreactores.

Quadro 7

Secreção	Espécie animal	Produto
Leite	Ratinho	- B lactoglobulina de ovino(1987) - activador do plasminogénio lissular humano(1987) - Urocinase humana (1990) - Hormona de crescimento humana (1994) - Fibrinogénio humano (1996) - Factor de crescimento de nervo humano (1999) - Spider silk (1999)
	Coelha Ovino Caprino	- Eritropoietina humana (1996) - antitripsina _ 1 humana (1991) - activador do plasminogenio tissular humano (1991)
Soro sanguíneo	Coelho suíno	- antitripsina _ 1 humana (1991) - anticorpos recombinantes (1991)
Urina	Ratinho	- hormona de crescimento humana (1998)
Semen	Ratinho	- hormona de crescimento humana (1999)

2.2.1 - Aspectos da geneterapia classica (Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.2)

Os genes terapêuticos podem ser introduzidos nas células directamente ou indirectamente e ficarem integrados nos cromossomas ou fora destes (episomas) e aquela introdução pode ser efectuada fora do organismo do doente ("ex vivo") ou dentro deste ("in vivo"). No primeiro caso são as células em cultura, transformadas pela introdução do gene seleccionadas e cultivadas "in vitro" que são depois introduzidas no doente convindo pois que se trate de células autólogas para evitar rejeições.

Em circunstâncias muito especiais a transferência de genes pode ser feita directamente "in vivo" para os tecidos do doente por vezes com a utilização como veículos de lipossomas e certos vectores virais.

Os genes terapêuticos a transferir devem ter certas características não podendo ser muito grandes, não sendo pois genes convencionais, devendo conter a sequência codificante completa, flanqueada por sequências reguladoras adequadas com promotores eficientes.

A integração dos genes exógenos em cromossomas pode permitir a perpetuação do gene através da replicação celular e inclusive chegar ás células germinativas, mas pode também ter desvantagens se essa inserção ocorrer ao acaso, pois nestas circunstâncias a sua localização pode variar muito de célula para célula e podem até não ser expressos, ou originar a morte da célula ou ainda ocorrer a possibilidade de formação de cancro por perturbação dos genes envolvidos na divisão ou proliferação celular.

Há situações em que são construídos sistemas para inserir genes no interior das células mas fora dos elementos cromossomais o que lhes pode permitir expressar-se em elevadas concentrações para efeitos terapêuticos o que em certas situações cancerígenas humanas têm sido ensaiado.

Na geneterapia o método a utilizar para a transferência do gene exógeno depende do tecido alvo e das circunstâncias, se as células são para cultivar "ex vivo" ou se é para actuar "in vivo", cada um desses métodos com vantagens e inconvenientes.

Nas células humanas a transdução com vectores virais mamíferos é um veículo preferido para estas transferências dada a sua alta eficiência. Mas a necessidade da inocuidade em relação aos vírus recombinantes, levou a notável incremento dos sistemas vectores não virais para esta geneterapia, quer através de lipossomas (eficiência baixa de tranferência, o DNA muitas vezes não se integra nos cromossomas, sendo a expressão transitória), injecção directa, ou com bombardeamento em particulas metálicas que revestem o DNA exógeno (a sua eficiência também é baixa tal como a sua integração) ou por endocitose mediada por receptor específico à superfície da célula (parece ter diversos inconvenientes).

2.2.2 - Aspectos da geneterapia não clássica

2.2.2.1 - Geneterapia e inibição de gene alvo e correcção de mutação "in vivo". (Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.3)

Nos seres humanos a inibição da expressão de um dado gene "in vivo" parece particularmente adequada para o tratamento de cancros, doenças infecciosas e desordens imunológicas, através do knockout da expressão de um gene específico. Também parece que este processo poderá servir para tratar certas desordens hereditárias.

A expressão de um dado gene pode ser inibida "in vivo" por vários processos e a diversos níveis nucleicos e proteicos (vide figura 18 seguinte). Assim:

1ª via) Por mutagenese "in vivo" desse gene tornando-o não funcional, a recombinação homóloga permitindo a mutagénese específica de um dado local no DNA. Esta técnica só recentemente foi realizada em células somáticas diplóides e é pouco eficiente.

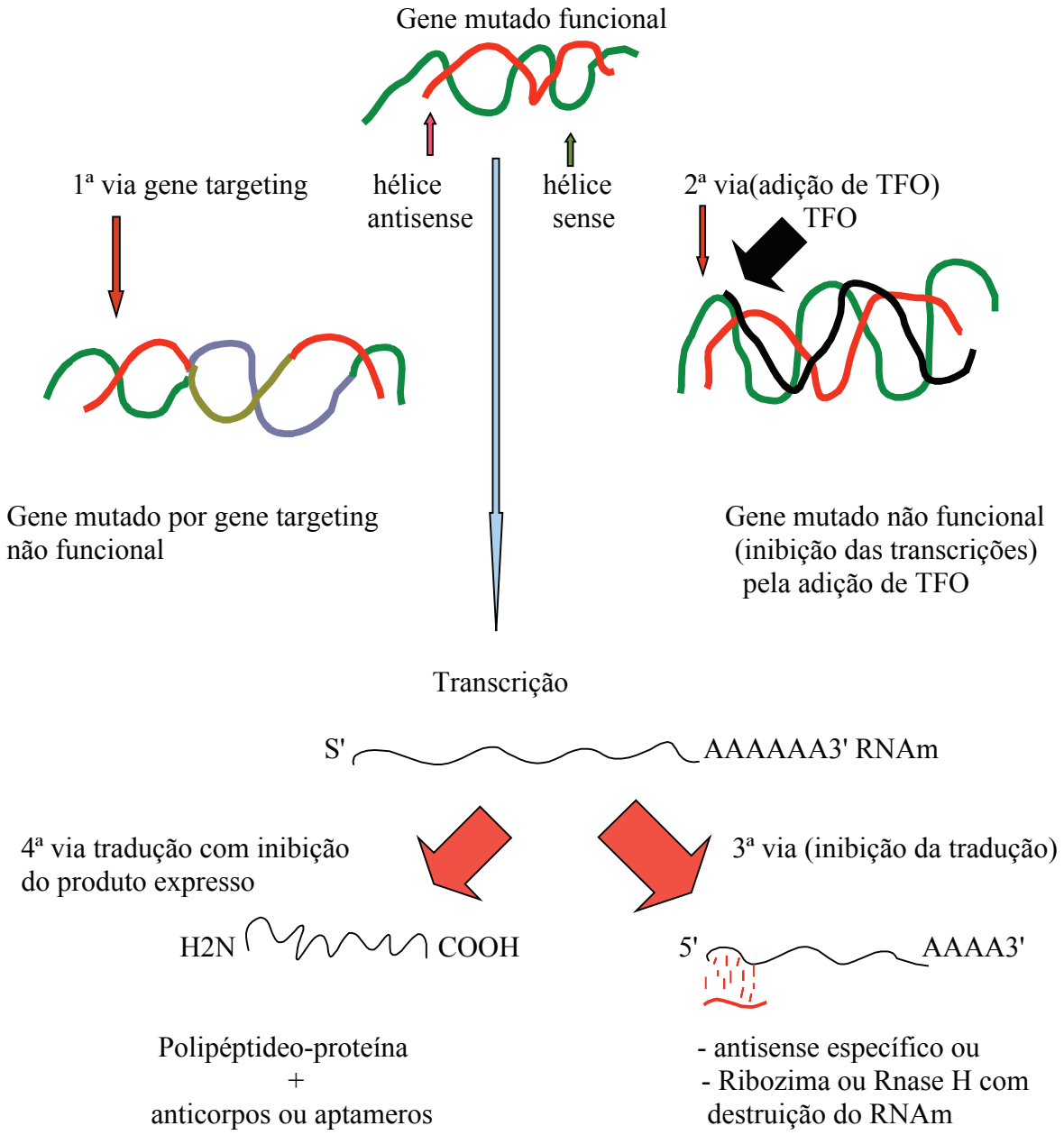
2ª via) Por bloqueio da transcrição desse gene.

3ª via) Ao nível da tradução inibindo esta por moléculas anti-sense ou por ribozimas.

4ª via) Ao nível proteíco, bloqueando os mecanismos post-tradução ou a exportação de proteínas.

Figura 18

A geneterapia pode basear-se na inibição específica de um determinado gene "in vivo"por diversas vias ou ainda pela correcção da mutação ao nível da sua tradução ou da sua expressão
(adaptado de Strachan T & Read, M.P., 1999 fig. 22.8)



Legenda

Na 1ª via o gene é mutado através da recombinação homóloga, sendo convertido numa forma não funcional.

Na 2ª via é bloqueada a expressão do gene mutado ao nível da transcrição ligando-lhe um oligonucleotido (TFO) formando um triplex específico com este gene, na região promotora.

Na 3ª via ao nível do m RNA formado pelo gene mutado funcional a ligação de um oligonucleotido anti-sense específico para o gene ou de i RNA bloqueia a tradução. Pode-se actuar com um gene anti-sense que codifique um ribozima em qualquer dos casos com destruição do RNA.

Na 4ª via a inibição ao nível da proteína/polipeplido é possível utilizando genes que produzam a formação de anticorpos intracelulares (intrabodies) ou aptameros que inibam o funcionamento da proteína.

2.2.2.1.1 – <u>A nível nucleico</u>

A – Gene "targeting"

Para a 1ª via já vimos anteriormente como pode ser alcançado este objectivo.

B – Inibição da transcrição

Na 2ª via o DNA pode formar hélices triplas, e, desde que se construa um oligonucleotido específico do gene, este terá fortes possibilidades de emparelhar com uma sequência definida do DNA onde se encontra o gene pretendido, inibindo a transcrição do gene.

Esta hibridização da hélice tripla ocorre através de pontes de hidrogénio de Hoogsteen.

C-Inibição ao nível do RNA

C1-Transgenes RNA anti-sense

Na 3ª via da figura anterior a terapêutica anti-sense é feita com oligonucleótidos ou polinucleótidos para o RNA, específicos para o gene, podendo esta construção, ser mesmo um ribozima.

A interacção entre moléculas de RNA sense e RNA anti-sense podem levar à formação de duplexes estáveis, que podem interferir na expressão dos genes ao nível da transcrição, processamento do RNA ou tradução.

Existem em pequena extensão nos eucariotas, ao contrário dos procariotas, mecanismos de regulação de genes através de RNA anti-sense.

A introdução de construções RNA anti-sense ou oligonucleótidos anti-sense numa célula pode desencadear a inibição temporária de determinados genes.

A transformação de células com transgenes anti-sense construídos (em alguns casos com inserção do transgene em relação ao promotor) pode promover inibições de genes a longo prazo.

A eficiência desta transformação é muito variada tal como por vezes a sua especificidade.

Um oligonucleótido que seja complementar na sua sequência de um m RNA é pois como uma sequência anti-sense.

Os oligonucleótidos ou polinucleótidos anti-sense construídos podem ligar-se ao RNA m especificamente, inibindo a sua tradução e levando à sua destruição. A transferência destes oligo ou polinucleótidos sintetizados, para o citoplasma celular e núcleo ocorre, mas não se ligam ao DNA de cadeia dupla dado o seu "desenho" particular.

C2 – ODN, oligodeoxinucleotidos anti-sense e PNA

Por vezes oligodeoxinucleótidos anti-sense (ODN) são construídos facilmente e podem também através de lipossomas migrar através do citoplasma até ao núcleo, tal como os oligonucleótidos.

Os ODN são menos susceptíveis ao ataque por nucleases do que os oligorribonucleotidos, embora as extremidades destas moléculas possam ser modificadas quimicamente para obstar a este acontecimento.

Os anti-sense ODN parecem ser de preferir para este efeito pois induzem a destruição do m RNA com que se hibridam através de ribonucleases específicas intracelulares, as Rnase H, que cinde a hélice de RNA.

Há bastantes exemplos de ensaios de geneterapia de cancros em seres humanos através de tecnologias anti-sense, contudo as legítimas espectativas criadas necessitam que sejam previamente esclarecidos inesperados efeitos não anti-sense.

Também ácidos nucleicospeptídicos (PNA) construídos sinteticamente, em que as bases nucleicas são ligadas a uma estrutura pseudopeptídica, possuem uma melhor flexibilidade que as moléculas de DNA ou RNA, o que lhes permite hibridar mais estávelmente com as moléculas de DNA ou RNA alvo, sendo ainda mais resistentes à degradação nucleasica, sendo uma outra hipótese alternativa à utilização de oligonucleótidos anti-sense.

Ainda, por outro lado, ribozimas dotadas de actividade enzimática numa das suas duas partes componentes, enquanto a outra parte é uma sequência específica para interacção com moléculas de RNA alvo, têm sido utilizadas para cindir substratos de RNA com que emparelham especificamente.

C3 – Ribozinas

As enzimas ribozimas são moléculas de RNA que realizam cisões em locais específicos de moléculas de RNA substrato e em alguns casos promovem também reacções de união.

Determinadas moléculas de RNA podem ser alvejadas através da incorporação de centros catalíticos de ribozimas em moléculas particulares de RNA anti-sense, e depois de alvejadas as moléculas de RNA são degradadas.

Por engenharia genética é possível desenhar sequências de reconhecimento, para o ribozima artificial, que sejam complementares de determinadas moléculas de m RNA podendo cindir zonas escolhidas nas moléculas de RNA mutadas inibindo assim a expressão do gene correspondente.

É possível construir um ribozima artificial que corte uma determinada sequência de um m RNA, basta escolher no alvo uma GUC (ou um tripleto variante) e depois desenhar o ribozima que contenha o componente catalítico habitual mas flanqueado por sequências complementares das sequências que flanqueiam o tripleto escolhido no m RNA alvo (figura 19).

Os ribozimas têm vantagens em relação ás simples moléculas anti-sense de RNA, uma vez que podem ser

reciclados após intervirem e inactivar diversas moléculas de m RNA.

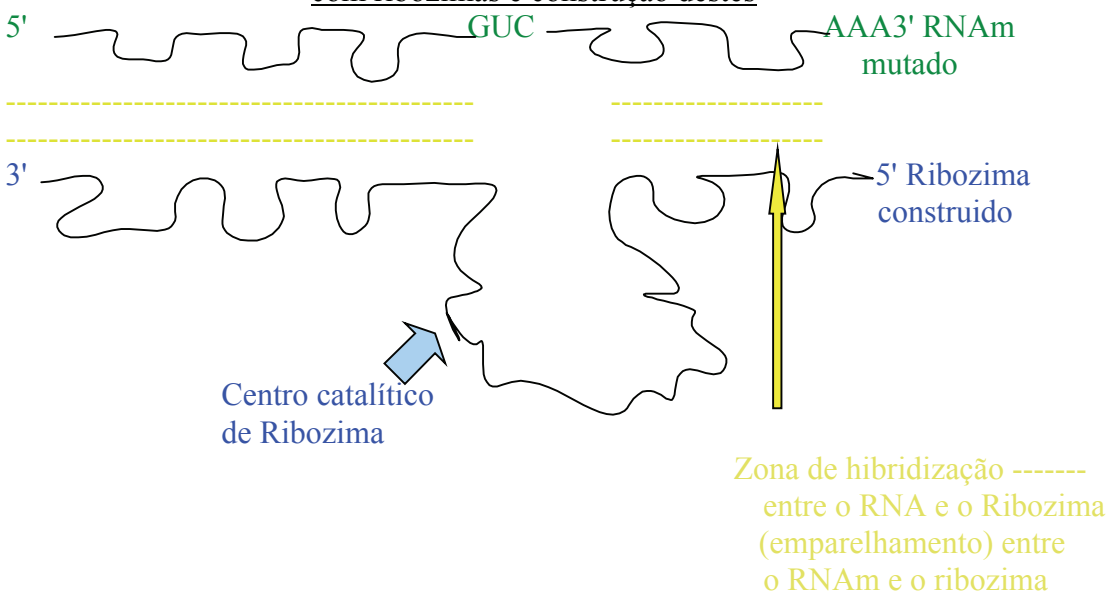
É possível construir ribozimas para inibirem especificamente determinados genes nos eucariotas, inclusivemente em linhas celulares de mamíferos.

Há profundos estudos em curso sobre construção de vectores transportando múltiplos ribozimas.

Também a expressão de ribozimas específicos de determinado tecido está assinalado.

Figura 19

Inibição de genes ao nível do RNA
com ribozimas e construção destes



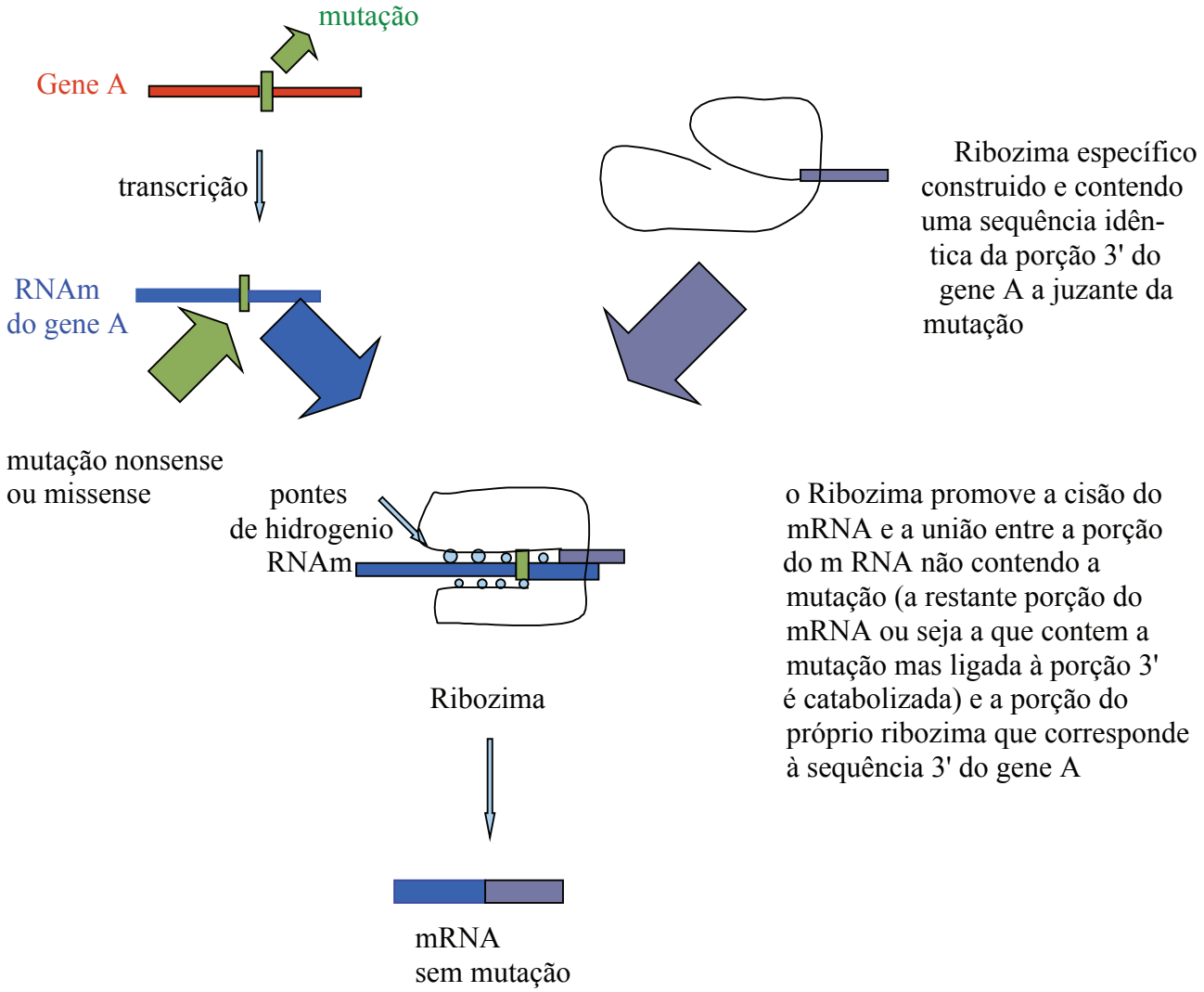
A construção foi realizada em ordem a que as sequências dos braços 3' e 5' do ribozima fossem complementares das sequências 5' e 3' que flanqueiam o local da cisão e splicing GUC do RNA m específico mutado que se pretendia alvejar.

Portanto basta escolher uma sequência apropriada GUC (ou um triplete variante) no RNAm alvo e desenhar o ribozima em ordem a que este possua o centro catalítico normal flanqueado pelas sequências complementares necessárias.

Contudo, como o RNA é muito instável, é desejável para geneterapias eficazes sintetizar e transferir para as células alvo genes codificadores do ribozima que se pretende.

Figura 20

Caso especial de reparação
de mutação ao nível de m RNA
por ribozima
(adaptado de Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – fig 22.10)



Este exemplo da figura 20 corresponde à utilização de um ribozima terapêutico que vai reparar por gene "targeting" o defeito genético ao nível do m RNA.

Se o transcrito m RNA contem uma mutação nonsense ou missense é possível desenhar ribozimas específicos que cortam o RNA acima da mutação e depois corrigir o transcripto. Esta biotecnologia está ainda no seu início.

2.2.2.1.2. - Inibição ao nível proteico

Anticorpos intracelulares (intrabodies) e aptameros

Na 4ª via esquematizada anteriormente a inibição da expressão ao nível proteico pode ser feita construindo aptameros oligonucleotidos (aptameros são pois oligonucleotidos que se ligam a sequências proteicas específicas de interesse)ou anticorpos intracelulares (intrabodies) que especificamente inactivam a proteína formada pelo gene em causa.
Os anticorpos intracelulares (intracorpos) podem ser construídos, tal como os aptameros oligonucleotidos e proteínas mutantes que inibam o desempenho de um polipéptido específico.

As células podem ser transformadas com construções de c DNA que induzam a expressão de anticorpos intracelulares, os intrabodies, para determinados alvos.

Os anticorpos sendo grandes proteínas multiméricas além do local para interacção com o antigénio possuem ainda na sua estrutura partes que não são essenciais para a inibição proteica intracelular.

Na construção destes c DNA para induzirem a formação destes "intrabodies" desenham-se formas modificadas dos anticorpos que podem inclusivamente ser dirigidas para um determinado compartimento subcelular, citosol, núcleo, mitocôndrias, etc.

Têm sido estudados anticorpos deste tipo para diversas finalidades por ex: para abolir a actividade de oncogenes, conferir resistência a vírus, etc.

Os anticorpos intracelulares são construídos através do desenho de genes codificantes de anticorpos intracelulares e não extracelulares como é habitual, possuindo uma simples cadeia polipeptídica contendo um domínio variável da cadeia pesada e um domínio variável da cadeia leve, unidos por um ligador peptídico, e mantendo a afinidade do anticorpo original (parent) e que podem inactivar dentro do compartimento subcelular que interessa uma molécula celular específica de uma proteína causadora de doença, podendo assim tratar certas doenças infecciosas.

Os aptameros oligonucleotidos adequadamente seleccionados têm capacidade para se unir com uma sequência proteica que interessa mas a sua capacidade real para geneterapia ainda não foi ensaiada tal como o desenho do gene para a utilização de proteínas mutantes.

Em resumo pode afirmar-se que uma mutação patogénica é passível de correcção artificial "in vivo", mas é muito ineficiente quer ao nível do DNA quer do RNA e por ora ainda é insusceptível de aplicação clínica.

2.2.3 – Geneterapia em desordens hereditárias (Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.4)

Dado o provável interesse futuro destas matérias em medicina veterinária, não queremos deixar de fazer um apanhado em relação aquilo que se sabe e vai sendo feito ou tentado em seres humanos.

No que se refere ás doenças hereditárias humanas o sonho de aplicar tecnologias genéticas moleculares para a sua cura têm sido muito ilusório, reconhecendo-se hoje as suas limitações bem como a necessidade de se alcançarem métodos de transferência de genes mais inócuos e eficientes.

Ocorre ainda que muitas desordens genéticas são de tratamento mais difícil do outras, estando muitas vezes em jogo complexos interactivos de diferentes loci genéticos e factores ambientais o que rouba eficácia à geneterapia directa.

Aquelas doenças resultantes de uma simples deficiência do produto de um gene específico são de mais fácil tratamento podendo as altas taxas de expressão de um alelo normal introduzido ser suficiente para ultrapassar a deficiência genética.

As desordens hereditárias recessivas são quase sempre devidas a mutações com a simples perda da função e em princípio são as desordens hereditárias mais facilmente tratáveis por geneterapia.

O primeiro ensaio de tratamento de uma doença hereditária por geneterapia foi a iniciada em fins de 1990 por a deficiência de adenosina deaminase (ADA) numa criança. Esta doença induz uma imunodeficiência severa combinada sobretudo em limfocitos T. O gene da enzima ADA é pequeno e muito estudado, e as celulas T são obtidas com facilidade para cultura posterior, facilitando a geneterapia "ex vivo".

Existem outros tratamentos para esta doença além de geneterapia.

Esta geneterapia inclui as seguintes quatro etapas:
(Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.4.2)

1) Clonagem de um gene ADA normal num vector retro viral
2)Transfecção do gene ADA recombinante para culturas de linfócitos T, ADA negativos, isolados do doente.
3)Identificação, isolamento e cultura dos linfócitos T ADA positivos
4)Re-implantação destas células no doente

Esta tecnologia não permite a cura , mas sim um tratamento que necessita ser repetido várias vezes. O tratamento com êxito necessita da transferência eficiente do gene para celulas estaminais da medula óssea, mas estas são muito difíceis de isolar nos seres humanos e a sua inserção com vectores retrovirais é muito deficiente.

A combinação de vários tipos de tratamento para esta doença tem melhorado alguns aspectos como por ex: menor número de infecções, mas é evidente que é necessário introduzir consideráveis melhorias na geneterapia para que este tipo de tratamento seja um sucesso.

Mostra-se no quadro 8 seguinte alguns exemplos
de ensaios de geneterapia em desordens
hereditárias em seres humanos
(Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – Tab.. 22.5)
Quadro 8

Desordem	Celulas alteradas	Estratégia da geneterapia
Deficiência ADA	Celulas T e celulas estaminais hematopoieticas	Ex vivo GAT utiliza retrovirus recombinantes ou lipossomas para inserir o gene ADA
Fibrose quística	Epitelio respiratório	In vivo GAT usando adenovírus recombinante ou lipossomas para inserir o gene CFTR
Hipercolesterolémia	Células hepáticas	Ex vivo GAT usando retrovírus para transmitir o gene do receptor LDL (LDLR)
Doença Glucocerebrosida de Gaucher	Celulas estaminais hematopoieticas	Ex vivo GAT usando retrovirus para transmitir o gene (GBA)

GAT = Terapia com aumento do gene.

Na hipercolesterolemia familiar, há deficiência nos receptores para as LDL que são normalmente sintetizados no figado e por um simples gene. Para esta geneterapia é obtido cirurgicamente um fragmento hepático e a partir dele são feitas culturas de células hepáticas que serão infectadas depois com retrovírus contendo o gene humano normal LDLR.

As células geneticamente assim modificadas são depois devolvidas ao doente através de um catéter aplicado num ramo do sistema venoso portal. Esta metodologia aguarda no entanto avanços significativos da eficiência da transferência do gene.

Noutra situação patológica dos humanos, a fibrose quística devido a mutações no gene CFTR que perturba o transporte de iões Cl^- através das celulas epiteliais, o principal orgão atingido é o pulmão. Infelizmente não são conhecidos métodos para cultura de células pulmonares no laboratório e daí terem sido tentados processos in vivo, utilizando adenovírus como vector do CFTR ou lipossomas veiculados por um broncoscópio ou por via nasal. Dificuldades várias sobretudo nas doses de vectores a utilizar, e complicações subsequentes tem tornado esta terapia ineficaz.

Também na distrofia muscular de Dachenne uma desordem recessiva severa ligada ao cromossoma X dos humanos, a geneterapia não tem progredido devido à falta de sistemas de transferência de genes adequados.

2.2.4 - Geneterapia em situações neoplásicas e doenças infecciosas (Strachan, T. & Read, A.P.,1999 – cap. 22.5)

Numerosos ensaios neste domínio da geneterapia do cancro têm sido realizados baseados numa estratégia em promover a morte de células cancerosas através da introdução de genes codificadores de toxinas, etc,

e noutras estratégias provocando respostas imunológicas fortalecidas. Diversos exemplos de geneterapias contra cancro estão descritas (Strachan, T. & Read,A.P.,1999 – cap. 22.7).

Em certas situações tem-se procurado alvejar simples genes como por exemplo o gene TP 53, ou os genes KRAS anti-sense.

No entanto os resultados concretos fazem sentir a necessidade de melhores métodos para a transferência e expressão dos genes utilizados, bem como respostas antitumorais eficientes.

No que se refere à geneterapia de doenças infecciosas as estratégias ensaiadas passam pelas tentativas de provocar respostas imunológicas específicas ou pela destruição específica das células infectadas baseadas todas elas no conhecimento do ciclo evolutivo do agente infeccioso.

As geneterapias ex vivo para situações cancerosas humanas passam na maioria das vezes pela tentativa de recrutar celulas do sistema imunitário para destruir as celulas tumorais. É o caso da transferência de genes como o factor de necrose tumoral _ (TNF – _) para linfócitos infiltrantes de tumores pretendendo-se aumentar a eficácia anti tumoral destes. No entanto além dos efeitos adversos colaterais para os seres humanos deste factor, também a sua fraca eficiência para ser introduzido em linfócitos humanos é notória.

Em animais de experiência tem sido tentado modificar as celulas tumorais murinas com a inserção de diversos genes codificadores de diversas citocinas (diversas interleucinas), TNF _ , interferão – _ (IFN), factor estimulador de colónias de macrofagos (GM-CSR), com resultados satisfatórios mas quando se passa das células tumorais para tumores sólidos de um certo tamanho os resultados já são menos satisfatórios.
Também a modificação de células tumorais do doente, modificadas geneticamente com uma série de genes para , imunizar doentes pode aumentar a resposta imunitária dos hospedeiros, mas é muito dificil o crescimento de células tumorais "in vitro", embora a cultura de fibroblastos seja mais fácil.

A geneterapia "in vivo" em certos tipos de cancro humano tem sido ensaiada por modificações genética das celulas tumorais como no caso de certos melanomas, tumores colorectais e uma série de tumores sólidos, utilizando a injecção directa de lipossomas contendo um gene codificador de HLA- _7 ou _2-microglubina, Noutras circunstâncias tem sido utilizado retrovírus com veículo de um gene codificador de um proquímico que confere sensibilidade para morte da célula após a subsequente administração do químico adequado.

No caso da geneterapia ensaiada em doenças infecciosas, tal como no caso dos cancros as células infectadas podem ser mortas directamente (por inserção de um gene codificador de uma toxina ou produto análogo) ou indirectamente favorecendo a resposta imunológica contra o agente infeccioso em causa.

Como já referimos o objectivo nestas circunstâncias passa pela interferência no ciclo vital do agente infeccioso, podendo em certas circunstâncias actuar ao nível do bloqueio da infecção ou da inibição ao nível do RNA ou ainda ao nível das proteínas expressas.

3 - Bibliografia e outras leituras sugeridas sobre manipulação genetica dos animais

- Arakawa, 71, Lodygin, D, & Buerstedde, J- M. - Mutant Lox P vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs-. BMC Biotechnology 2001, 1:7
http://www.blomedantral.com/1472-6750/1/7

- Brown, T.A. - Gene Cloning and DNA Analysis. An introdution, Blackwell Science (fourth edition), 2001

- Cre-Lox P recombination
http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/methods/CreLoxP.html

- Genetic recombination – Wikipedia, the free encyclopedia
http://en.wikipedia.org/wiki/genetic_recombination

- Homologous recombination & knockout mouse -
http://www.bio.davidson. edu/courses/genomics/methods/homoirecom...

- Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore & Darnel.
Molecular Cell Biology (8.5. Gene replacement and transgenic animals)
W.H.Freeman and company. 2000 – acessível através da internet em NCBI Bookshelf

-Primrose, S.B., Twyman, R.M. & Old, R.W.- Principles of Gene Manipulation-
Blackwell Science, 2001 (Sixth Edition), 2001

- Strachan, T & Read, A.P. - Human Molecular Genetics 2. Garland Science, 1999. acessível através da internet em NCBI Bookshelf.[13.4. Life in the post-genome (sequencing) era].

- Strachan, T & Read, A.P. - Human Molecular Genetics 2. (20.4. Methods for transferring genes into cultured animal cells). Garland Science c, 1999. acessível através da internet em NCBI Bookshelf

- Strachan, T & Read, A.P. - Human Molecular Genetics 2. (21.1. An overview of genetic manipulation of animals, Bios Scientific publishers , Lld, 1999) acessível através da internet em NCBI Bookshelf

- Strachan, T & Read, A.P. - Human Molecular Genetics 2. (22.1. Principles of molecular genetic-based therapies and treatment with recombinant proteins or genetically engineered vaccines).
Garland Science c, Ltd, 1999. acessível através da internet em NCBI Bookshelf

- Strachan, T & Read, A.P. - Human Molecular Genetics 2. (22.2. - the Technology of classical gene therapy). acessível através da internet em NCBI Bookshelf

-Strachan, T & Read, A.P. - Human Molecular Genetics 2. (22.3. - Therapheutics based on target inhibition of gene expression and mutation correction in vivo. acessível através da internet em NCBI Bookshelf

-Van der Weyden, L, Adams, D.J., & Bradley, A. - 2002 Tools for target manipulation of the mouse genome.Physicol. Genomics 11:133-164

CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO (NT) NOS ANIMAIS

ÍNDICE

1 – Introdução 66

2 - Os oócitos e as células dadoras de núcleo na clonagem NT 72

3 - Outros factores que contribuem para a ineficiência da clonagem por NT 75

4 - Clonagem de mamíferos por NT e expressão de alguns genes 79

5 - Produção de bovinos clonados por NT, tipos de células dadoras e um exemplo de clonagem por NT de um bovino 80

6 - Clonagem de canídeos 83

7 - Clonagem de gatos 84

1º - Recuperação de oócitos e sua maturação[1] in vitro 85
2º - Enucleação 86
3º - Cultura de células e preparação de células dadoras de núcleo para NT 86
4º - Transplante de núcleos (NT) e electrofusão e activação do oócito 86
5º - Sincronização das fêmeas recipientes e transplante de embriões 86

8 - Clonagem de solípedes 87

9 - Clonagem de ratazanas 88

10 - Clonagem de coelhos 89

11 - Clonagem por transferência de núcleos (NT) entre diferentes espécies animais 89

12 - Perspectivas na clonagem terapêutica 90

13 - A clonagem e a performance dos animais 91

14 – Large offspring syndrome (LOS)nos animais 93

15 - Algumas perspectivas da clonagem por NT dos animais 94

Bibliografia 96

1 - INTRODUÇÃO

A clonagem animal é a reprodução assexuada de um indivíduo em que a descendência deste tem um genoma nuclear essencialmente idêntico ao seu (Mullins, L. J. 2003)

Há diversos tipos de clonagem sendo os de maior interesse para nós os seguintes:

Tipo 1- a partir de uma célula original, por divisão mitótica gera-se um grupo de células geneticamente idênticas. A célula original cria um novo conjunto de cromossomas e divide-os pelas duas células filhas. É o que acontece, por exemplo, nas culturas celulares feitas a partir de uma única célula inicial.

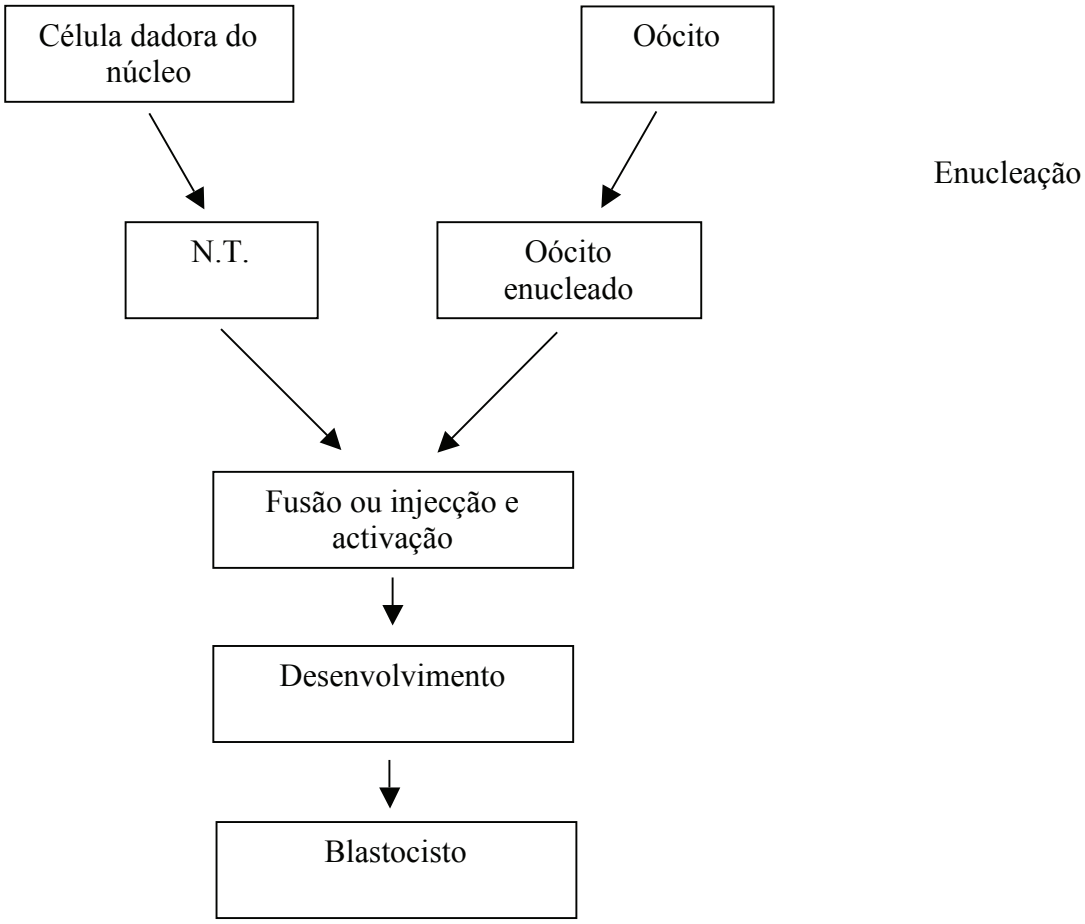
Tipo 2- a partir de um DNA original podem produzir-se, por técnicas de biologia molecular adequadas, por exemplo, por PCR, uma série de moléculas idênticas à original, o que é designado por clonagem molecular ou clonagem de DNA.

Tipo 3- a partir de um embrião, por fraccionamento deste, podem produzir-se animais idênticos. É isto que sucede naturalmente com os gêmeos idênticos, quando se encontra o estadio com duas células apenas. Nos bovinos, a partir de embriões com 4 e 8 células (blastómeros) podem ser obtidas células individualizadas, e implanta-las em diferentes mães de aluguer, podendo depois desenvolver-se normalmente produzindo as respectivas crias (clones).

Tipo 4- neste outro tipo de clonagem a transferência ou transplante do núcleo (N.T.) de uma célula de um organismo para um oócito ao qual foi removido o núcleo pode permitir a criação de um ou mais animais geneticamente idênticos.

Clonagem nuclear, transferência de núcleo ou transplante nuclear (N.T) corresponde pois à introdução de um núcleo de uma dada célula dadora, adulta, fetal ou embrionaria, num oócito enucleado, produzindo um embrião clonado. Este é transferido para o útero de uma fêmea recipiente e tem potencial para gerar um novo ser, um clone da célula dadora do núcleo o que constitui a clonagem reprodutiva(ver esquema seguinte). As tecnologias para clonagem podem ser um tanto variáveis consoante as espécies animais onde são ensaiadas, tornando-se necessário para o efeito um bom conhecimento do processo reprodutivo que ocorre em cada espécie animal, e dos possíveis obstáculos que podem surgir numa dada espécie.

Esquema geral da N.T



As células dadoras de núcleo (podem ser ou não transfectadas) são seleccionadas, podendo ser sincronizadas antes da N.T.

Os oócitos são enucleados por remoção dos cromossomas na metafase, assim como o primeiro corpo polar (Kühholzer, B. et Prather, B.S., 2000)

As células dadoras do núcleo são depois transferidas para debaixo da zona pelucida do oócito onde são fundidas e activado o oócito ou então o núcleo da célula dadora pode ser injectado no citoplasto do oócito.

As células, quando diferenciadas e em cultura, têm um diâmetro menor relativamente aos blastómeros o que pode dificultar a fusão da célula dadora de núcleo com o citoplasto recipiente (oócito enucleado) (Wells, D.N. et alii 1997; Lavoir, MC et alii 1997; Dominic, T et alii, 1999) uma vez que o prévio alinhamento eléctrico das células se torna impossível dado o diferente tamanho das células, o que tem levado alguns investigadores ao alinhamento manual das células ou á manipulação do meio em que isto decorre (Kühholzer, B. et Prather, B.S., 2000).

A injecção intracitoplasmica da célula dadora tem permitido obter descendência em ratinhos (Wakayama, 1998), bovinos (Goto, K, 1997) e suínos (TAO, T, 1999).

Após a fusão simultânea e activação, o núcleo doado é completamente remodelado o que implica trocas entre a célula dadora de núcleo ou o núcleo doado e o citoplasto (oócito enucleado) (Prather, R.S, 1989).

Com oócitos préactivados ou envelhecidos, com baixos níveis de MPF (factores de promoção da maturação) a quebra do envólucro nuclear não ocorre ou ocorre só parcialmente (Barnes, FL, 1993)

Utilizando para a N.T células diferenciadas é necessário um mais elevado grau de reprogramação (facilitado por altas taxas de MPF) do que com os blastómeros de embriões em fases iniciais.

No passado a modificação genética dos animais domésticos não conseguia ser finamente controlada. Hoje com a tecnologia da N.T. é possível dispor das bases para criar alguns animais domésticos com modificações genéticas específicas e precisas, e através de uma diversidade de tipos celulares, embriónicos, fetais e adultos, como dadores de núcleo.

Como referiremos mais adiante, a fase do ciclo celular das células dadoras de núcleo ou receptoras destes, são muito importantes nos desenvolvimentos subsequentes.

Nas fontes dadoras de cariótipos foi possível verificar que nos bovinos, as células estaminais embriónicas não têm permitido até hoje gestações até ao seu termo, em consequência de deficiências, ou ausência de cotiledones e respostas hemorrágicas nos carúnculos (Kühholzer, B. et Prather, B.S., 2000). Também tentativas para a partir de células germinativas primordiais (PGC), estabelecer células germinativas embriónicas (EG) semelhantes ás células estaminais embriónicas, não produziram descendência em virtude dos embriões resultantes serem pequenos e com placentas anormais. No entanto foram produzidos vitelos por N.T. a partir de fibroblastos fetais (Wells, DN, 1997; Libelli, J B, 1998; Zakhartchenko, V, 1999), e caprinos a partir de linhas celulares fetais cultivadas e com oócitos maturados "in vivo" (Baguisi, A, 1999) ou "in vitro" (Keefer, CL, 1999).

Após mais de uma década de estudos, não tem sido possível isolar linhas de células estaminais embriónicas (ES) de qualquer espécie de animal doméstico com excepção dos ratinhos e mais recentemente de frangos (Pain, B. et alii 1999, Prelle, K. et alii, 1999).

Contudo têm sido isoladas e até transfectadas células germinativas primárias (PGC), células embriónicas que originam os gâmetas, que podem ser cultivadas como células germinativas embriónicas (EG) muito parecidas com as ES e que podem ser transfectadas directamente.

Têm sido isoladas células PGC de frangos e mamíferos, as primeiras podendo chegar à produção de descendência, enquanto que com as dos mamíferos tem sido difícil que elas, após transformação, originem células da linha germinativa.

Na N.T. em suínos, a eficiência da clonagem é bastante menor que a alcançada noutras espécies o que é justificado com a mais alta sensibilidade dos oócitos porcinos para o flurocromo utilizado rotineiramente nessa biotecnologia, e ao alto conteúdo lipídico dos oócitos porcinos, bem como a uma transição maternal zigótica precoce.

No entanto, têm sido assinalados êxitos em suínos, a partir de fibroblastos fetais (Du, ZT, 1998;TAO,T, Boquistac, 1999, TAO,T et alii, 1999) e de fibroblastos transfectados.

Na técnica de N.T. pode ser transferido apenas o núcleo ou pode a célula intacta ser injectada ou integrada no oócito enucleado, e neste último caso a célula dadora do núcleo tem que ser fundida com o oócito e o embrião reconstruído activado por um curto pulso eléctrico.

No caso dos ovinos os embriões resultantes da N.T. são cultivados 5, 6 dias e aqueles que parecem ter um desenvolvimento normal (cerca de 10% das fusões efectuadas) são implantados em mães de aluguer, conseguindo-se assim animais vivos, e tornando possível a introdução muito mais precisa de modificações genéticas nos animais se isso porventura interessar (transgenese).

A ovelha Dolly criada em 1996 na Roslin Institute, foi o primeiro animal clonado a partir de uma célula dadora de núcleo, extraída da glândula mamaria de um ovino com 6 anos.

A utilização de células diferenciadas para N.T. teve pela primeira vez êxito com ovinos, foi o caso da utilização de células mamárias adultas cultivadas (Wilmut, I, 1997), e hoje não restam dúvidas depois destas experiências com células adultas diferenciadas terem tido êxito inclusive em bovinos, que estas células diferenciadas podem ser reprogramadas como é o caso de células cumulus (Kato, 1998), células murais da granulosa (Wells, 1999) e células mamárias (Vignor, 1999 , Zakhartchenko, 1999). No entanto a capacidade de produção de descendência ainda é muito baixa e ao redor de 1% como veremos adiante.

As células adultas diferenciadas não se encontram pois modificadas geneticamente de forma irreversível e o seu DNA pode ser reprogramado para dirigir o desenvolvimento embriónico.

Após 1996 foram clonados, por diversos grupos e em diversos países, ratinhos, bovinos, ovinos, caprinos e suínos, havendo no entanto maiores dificuldades para a clonagem de coelhos, ratazanas, macacos, cães, gatos e solípedes, o que talvez se deva ás diferenças que existem nas primeiras fases de desenvolvimento embriónico entre as diversas espécies aminais. Assim nos ovinos e seres humanos, o embrião divide-se até ás 8-16 células antes dos genes do núcleo efectuarem o controlo desse desenvolvimento, enquanto nos ratinhos esta transição embriónica nuclear ocorre logo no estádio das duas células.

O sucesso alcançado com embriões reconstruídos por N.T. originando nado vivos é muito baixo em todas as espécies animais sendo em média cerca de 1%.

A ineficiência da clonagem por N.T. é pois muito elevada e no ratinho e noutros animais conhece-se a importância, neste contexto, da escolha da célula dadora de núcleo (somática, germinativa, embrionária, fetal ou adulta, quiescente ou em divisão activa) e do oócito.

Por outro lado muita da descendência destas clonagens por N.T. morre ainda durante a gravidez (muitas vezes por desenvolvimento anormal da placenta), ou pouco depois do nascimento, devido a problemas respiratórios ou cardio-vasculares.

Pode suceder ainda que diversos bovinos e ovinos clonados nasçam muito maiores do que os animais normais não clonados (vide adiante Síndroma LOS – Large Offspring Syndrome)

Uma explicação plausível para estas anormalidades ocorrendo nas situações de clonagem por N.T. de células somáticas adultas, pode ser a do estado de metilação do DNA das células somáticas dadoras do N.T. terem uma diferente estrutura da cromatina, daquela que se observa no esperma e no óvulo, tal como a reconfiguração da estrutura da cromatina após a fertilização decorrerem diferentemente nas duas situações.

Uma reprogramação incompleta ou desapropriada do núcleo transferido pode ocorrer dentro de algumas horas após a activação dos embriões reconstruídos, e dai a desregulação da expressão dos genes e a impossibilidade do embrião ou feto se desenvolverem normalmente.

A N.T. necessita portanto de núcleos intactos e com cromossomas funcionais.

A N.T. necessita por outro lado de oócitos e de mães de aluguer para levar os embriões clonados até ao seu termo, devendo estes ser dentro da mesma espécie e de raças muito próximas.

A N.T. pode ser utilizada com duas finalidades, assim:
1º- Para obter cópias idênticas de determinados animais (clones) com finalidades de produção animal ou outras (clonagem reprodutiva).
2º- Para produzir células em cultura para depois as utilizar em animais vivos, por exemplo na clonagem terapêutica, após introdução ou não de modificações genéticas desejáveis (transgenese) nessas populações celulares.

Em termos práticos a clonagem referida em 1º tem sido utilizada em bovinos e suínos, as espécies de maior interesse pecuário, devendo para ser eficazes essas clonagens ser integradas sistematicamente nos programas de reprodução, preservando a diversidade genética.

No 2º caso pode visar-se além da clonagem terapêutica directa, a produção de proteínas terapêuticas para utilização (animais biorreactores) por exemplo, em seres humanos ou inclusivamente a xenotransplantação de órgãos e tecidos ou mesmo para outras manipulações genéticas desejáveis, como, por exemplo, a produção de animais experimentais, correcção de patologias diversas, geneterapia, etc...

Assim têm sido produzidas proteínas humanas no leite de ovinos, caprinos e bovinos transgénicos (por exemplo: alfa-1- antitripsina para o tratamento da fibrose cística e enfizemas).

Também suínos geneticamente modificados têm sido apontados como possíveis dadores de órgãos após N.T., em que genes de suínos foram deletados para eliminar o gene da alfa-galactose transferase, responsável por criar grupos de carbohidratos nos tecidos suínos em grande parte responsáveis pela rejeição imediata de um orgão de suíno transplantado para um ser humano.

Os transplantes celulares obtidos de determinados dadores são passiveis de rejeição pelos animais receptores, a não ser que essas células derivem do próprio animal receptor (células autólogas)

A clonagem por N. T. a partir de animais adultos e a partir de diversos tipos de células prova pois, que o oócito e o embrião em fases iniciais têm capacidade para reprogramar a cromatina do núcleo até originar células plenamente diferenciadas.

Os núcleos dadores tomados de embriões em estádios de desenvolvimento progressivo, originam correlativamente, uma menor proporção de embriões reconstruídos que chegam a termo. (Willmut, I, 1997)

É também conhecido que células estaminais embriónicas podem gerar diversos tipos de tecidos e que células estaminais adultas perdem muita desta capacidade.

As células estaminais embriónicas (ES) derivam da massa de células interior (ICM) de embriões muito em início de formação e as de ratinho mantidas em condições de cultura adequadas podem manter-se indefinidamente “in vitro” sem se diferenciarem, constituindo linhas celulares.

As ES são difíceis de obter e não têm sido isoladas como linhas celulares a partir dos animais das espécies pecuárias.

Algumas populações de células estaminais adultas podem originar diversos tipos celulares. Estas células consoante as suas proveniências têm vantagens e desvantagens relativas para diversos tipos de aplicações.

As linhas ES têm uma tremenda capacidade para se replicar e adaptar a modificações genéticas nelas introduzidas.

Veremos adiante noutro tema as características de algumas células, totipotentes (ES), pluripotentes e diferenciadas.

A obtenção de clones a partir da N.T. de células somáticas foi conseguida mais facilmente em cinco espécies animais, ovinos (1996), bovinos (1998), ratinhos (1998), caprinos (1999) e suínos (2000). (ver quadro seguinte da historia da clonagem N.T.)

Historia da clonagem N.T. a partir das células somáticas adultas

1952	Briggs e King clonaram rãzinhas
1996	Foi clonada a ovelha Dolly, o primeiro mamífero a ser clonado a partir de uma célula adulta
1998	Foram clonados ratinhos
1998	Foram clonados bovinos
1999	Foram clonados caprinos
2000	Foram clonados suínos
2001	Foi clonado um gato
2002	Foram clonados coelhos
2003	Foram clonados ratazanas
2003	Foram clonados um macaco e um cavalo
2004	Foram clonados bovinos em série
2005	Foi clonado um canídeo

No entanto, inicialmente noutras espécies animais, esta N.T. a partir de células somáticas permitia o desenvolvimento de embriões mas não a obtenção de descendência, era o caso das ratazanas, coelhos, cães, gatos e alguns primatas. Contudo à medida que as metodologias biotecnológicas foram evoluindo foram clonados por N.T. a partir de células somáticas gatos (2001), coelhos (2002), ratazanas (2003), solípedes (2003) e canídeos (2005).

Estas diferenças entre as diversas espécies animais no êxito da N.T. a partir de células somáticas foram verificadas também anteriormente com outras metodologias tais como a cultura de embriões ou a congelação de embriões.

Diversos tipos de células têm sido utilizadas com êxito como dadoras para N.T.. Contudo parece que algumas células terminalmente diferenciadas não são aptas como dadoras para N.T., apesar de se conseguir descendência a partir de células da mesma linhagem mas em estádios mais precoces do seu desenvolvimento.

Os embriões reconstituídos por N.T. que conseguem originar descendência viável são por ora em número inferior a 1%, como já se referimos, independentemente do protocolo utilizado ou do tipo de célula dadora de núcleo. Esta situação parece resultar de falhas que se vão acumulando ao longo de todos os estádios de desenvolvimento do embrião, embora 10-50% dos embriões produzidos se desenvolvam até ao estádio de blastocisto.

Por outro lado após a transferência dos embriões para as fêmeas receptoras, ocorrem mais perdas em todas as fases da gestação, muitas vezes associando-se a morte com anormalidades várias, ou mesmo sem anormalidades.

Em experiências realizadas no Roslin Institute em Edimburgo, com ovinos clonados, apurou-se que 42% dos cordeiros morrem poucos dias após o nascimento. Nas anormalidades assinaladas encontram-se anormalidades placentárias, pulmonares, cardiovasculares e outras.

Potencialmente algumas células dos tecidos adultos têm sido isoladas e cultivadas, podendo, após transferência dos tecidos para meios de cultura "in vitro", originar células filhas convertidas noutros tipos de células, em circunstancias apropriadas.

Esta conversão em diferentes tipos de células ocorre através de mecanismo ainda relativamente desconhecido, mas factores no meio ambiente local têm papéis críticos neste controlo da diferenciação das células adultas em outros tipos específicos de células, ou seja, na sua plasticidade.

Esta plasticidade é necessária para esta conversão, quer ao nível do núcleo quer das próprias células, ao nível do DNA, podendo admitir-se que nos factores do ambiente extra-celular que regulam esta plasticidade se encontrarão no caso das N.T. proteínas intracelulares do oócito receptor do núcleo transferido ou do embrião.

Admite-se que ocorra uma sequência de modificações na expressão dos respectivos genes, durante esta plasticidade mais do que a perda de actividade de certas regiões do DNA.

Isto terá início logo após a formação do embrião, que inicialmente será controlado pelas proteínas e mensagens contidas no oócito quando da ovulação.

2 - OS OÓCITOS E AS CÉLULAS DADORAS DE NÚCLEO NA CLONAGEM NT

No que se refere à eficiência da clonagem por N.T. admite-se que se possa ampliar esta através do aumento da uniformidade dos oócitos recipientes e das células dadoras de núcleo (Miyoshi, K. Et Alii, 2003)

Os oócitos sofrem um longo período de desenvolvimento que se inicia logo na primeira metade da vida fetal.

No entanto para que possa ocorrer a fertilização é necessária uma fase final de maturação que ocorre antes dele ser libertado do ovário na fêmea adulta.

Esta maturação antes da ovulação decorre no ambiente do folículo ovárico em que o oócito é envolvido por células cumulus que constituem como que uma nuvem de células granulosas. No que se refere ao oócito propriamente dito, por fora da sua membrana plasmática, encontra-se um invólucro sem

células, a chamada zona pelúcida, e depois uma massa viscosa de células cumulus intimamente aderentes umas ás outras.

No momento da ovulação a parede do folículo rompe-se libertando algum líquido folicular, juntamente com uma massa de oócito – células cumulus. Esta massa passa depois "in vivo" no infundibulum, entra na ampola do oviducto onde as células cumulus são perdidas rapidamente e a fertilização ocorre logo a seguir, se for caso disso (http://www.ansci.cornell.edu/courses/as150/labs/lab3.html)

No entanto após intervenções cirúrgicas adequadas aquela massa de oócito – células cumulus pode ser aspirada de folículos puncionados na fase final da maturação, para posteriores manipulações "in vitro" com microscópios de disseção e obtenção de oócitos ou de células cumulus.

O oócito nos bovinos é uma célula muito grande com cerca de 100 micras, enquanto cada célula cumulus têm cerca de 10 micras.

Curiosamente em oócitos de bufalas (Warriach, H. M. e Chohan, K. R., 2004) aqueles que têm um seu redor camadas intactas de células cumulus e camadas mais espessas, têm melhor competência meiótica e maior eficácia para maturação "in vitro".

2.1 - ALGUNS ASPECTOS DOS OÓCITOS RECIPIENTES (MIYOSHI, K. ET, ALII, 2003)

Nos processos de transplantação dos núcleos estão envolvidos a enucleação dos oócitos, a fusão e activação de células e ainda os processos de cultura "in vitro" dos embriões, além de vários outros processos, todos eles implicados na eficiência da obtenção de descendência clonada.

Sendo o oócito (citoplasto) a única célula que reprograma o núcleo transplantado, constitui só por si uma fonte condicionadora dos resultados obtidos com a clonagem.

Por outro lado, a preparação do núcleo transferido para ser reprogramado tem profundas implicações em todo este contexto.

Há que proceder, pois, à selecção do oócito recipiente para a N.T. a partir de células diferenciadas.

É conhecido na fertilização " in vitro" (Wang, WH et alii, 1997) que o processo de maturação do oócito é crucial para a obtenção de oócitos de qualidade aptos a serem fertilizados e originarem um desenvolvimento embriónico normal.

A manutenção desadequada dos oócitos origina falhas e anormalidades (Moor, BM.et alii, 1998)

Há sugestões de que elevadas concentrações de actividade de factor MPF (maturation/meiosis/mitosis-promoting factor) são precisas para reprogramar o núcleo transferido de uma célula já diferenciada.

A actividade deste factor MPF ao longo da maturação dos oócitos é máxima nas etapas I (MI) e MII (Campbell, KHS et alii, 1998).

Estudos comparativos feitos com oócitos MI e oócitos MII em mamíferos parecem indicar que os oócitos MII são mais apropriados para clonagem a partir de células diferenciadas sendo o MPF necessário mas não suficiente para se obter o máximo desenvolvimento dos embriões, reconstruídos.

Parecem existir diferenças na qualidade dos oócitos consoante eles são maturados "in vitro" ou "in vivo", sendo necessário metodologias para identificar os melhores para a clonagem (Miyoshi, K. et alii, 2003)

Também os oócitos derivados de animais pré- pubres em relação a animais adultos, revelam nos bovinos, diâmetro menor e reduzidas concentrações proteicas (Duby, RT et alii, 1996; Gandalfi, F. et alii, 1998; Leveske, J.T et alii, 1994; Khatir, H et alii, 1998), alem de diferenças ultra estruturais e citoquímicas.

Também após maturação "in vitro", relativamente à "in vivo", os oócitos derivados de bovinos pré-pubres revelam menores taxas de MPF e MAPK (mitogen-activated protein kinase) e receptores inositol 1,4,5- trifosfato e menor capacidade para originar blastocistos, parecendo suceder o mesmo em suínos.

2.2 - ALGUNS ASPECTOS DAS CÉLULAS DIFERENCIADAS COMO DADORAS PARA N.T. (MIYOSHI, K. ET ALII, 2003)

Têm sido utilizadas para este efeito, como já vimos, diversos tipos de células tais como células embriónicas, fibroblastos, células da glândula mamária, células cumulus, células do oviduto, leucócitos, células da granulosa, células germinativas, células hepáticas, etc... quer de animais adultos quer de recém nascidos, fetais, machos e fêmeas, pelo menos nos bovinos (Brem e Kuhholzer, 2002).

Não parece quanto á produção de blastocistos que a sua eficácia varie muito, excepto no caso extremo em que se comparam as células musculares do tecido fetal com células hepáticas adultas de macho.

Também não parece, comparando fibroblastos fetais e adultos de bovino, que ocorram diferenças no que se refere à fusão, segmentação e formação de blastocistos (Niemann, et alii, 2002).

A cultura "in vitro" das células dadoras, antes da N.T. pode originar alterações genéticas. Normalmente, são utilizadas células com menos de 10 passagens, mas em bovinos Kubota, C. et alii, 2000 alcançaram êxitos com células com 10 e 15 passagens.

Normalmente são utilizadas para a N.T. células dadoras quiescentes paradas nas fases G0/G1 do ciclo celular, tendo o método especifico para a paragem do ciclo celular nestas fases, importância na sobrevivência fetal de termo e na sobrevivência dos recém nascidos (Gibbons et alii, 2002).

Têm sido utilizadas metodologias para este efeito á base de inibidores reversíveis do ciclo celular (Alessi, F. et alii, 1998).

As células podem ser sincronizadas nas etapas G0/G1 com a ajuda de carência de soro sanguíneo no meio da cultura e paragem do crescimento quando as células em cultura atingem a sua confluência. Tem sido utilizada a roscovitina, um inibidor específico da CDKz (Cyclin dependent Kinase) para este efeito, parecendo tratar-se de um inibidor reversível.

Atente-se que diversas linhas celulares derivadas do mesmo tecido ou órgão (Kato, Y. et alii. 2000) podem diferir quanto à sua eficiência para efeitos de clonagem. Isto têm sido verificado pelo menos em bovinos e suínos, o que talvez se deva a diferentes efeitos epigenéticos.

3 - OUTROS FACTORES QUE CONTRIBUEM PARA A INEFICIÊNCIA DA CLONAGEM POR N.T. (MULLING; L.J. ET ALII, 2003)

Em primeiro lugar a enucleação do oócito significa um trauma enorme para esta célula tal como as condições em que vão ser cultivados e ainda a agressão da introdução de um núcleo (dador) por microinjecção ou electrofusão. A activação do oócito e o seu "timing" e a sua reprogramação a operar antes dos destinos a serem tomados pelas células emergentes, tais como a diferenciação do trofoblasto, a implantação e o desenvolvimento dos tecidos embriónicos e extra embriónicos, são outras etapas que podem estar na base de limitações várias.

Uma complicação significativa na N.T. de células somáticas é o mau funcionamento do trofoblasto levando a insuficiências da placenta. Cerca de 1/3 dos embriões clonados em vacas e ovinos abortam durante a gestação (Paterson, L., 2002).

Nos bovinos as perdas em fases mais tardias (após 90 dias de gestação) chegam a 40% nas N.T. somáticas, enquanto os embriões clonados (por fusão de blastomeros com oócitos enucleados) se ficam nos 4,3% e nos 0% na fertilização "in vitro" (Heyman, Y. et alii. 2002).

A superacumulação de fluído placentário afecta 40% das gravidezes com embriões clonados.

Nos ratinhos clonados a placenta é 2 a 3 vezes maior do que nos fetos não clonados.

Também após N.T. as perdas por morte dos recém nascidos e a produção de descendências anormais são comuns.

Nos bovinos, o peso à nascença de vitelos clonados por N.T. de células adultas somáticas é mais elevado do que nos vitelos de IVF (in vitro fertilization) e a taxa de sobrevivência mais baixa (Heyman, Y. et alii. 2002).

Muita da descendência clonada morre nas primeiras 24 horas após o nascimento em virtude de perturbações respiratórias e cardiovasculares, surgindo ainda outras complicações como gestações prolongadas acumulação de fluidos e órgãos dilatados.

A enucleação dos oócitos é normalmente feita por micromanipulação e a introdução do núcleo dador no oócito é feita por microinjecção ou por fusão, parecendo que quanto mais maduro estiver o oócito melhor recipiente será para a N.T.

No núcleo transplantado ocorre "disassembly" em consequência das elevadas concentrações de MPF (factor promotor da maturação) no citoplasma oócitico em metafase II (MII) havendo sugestões, como referimos anteriormente, de que quanto mais maduro estiver o oócito melhor receptor será para a N.T..

Após a activação artificial (química ou eléctrica) do oócito transplantado, ocorre o "reassemble" nuclear.

A activação após a N.T. parece ser vantajosa para o desenvolvimento subsequente embora não seja essencial no caso dos bovinos (Kubato et alii, 2000), e nos ovinos a activação tardia não tem efeito. Nem os zigotos activados nem os óocitos activados são recipientes apropriados para a N.T.

3.1 - N.T. DE CÉLULAS SOMÁTICAS

No quadro seguinte faz-se uma comparação das eficiências da clonagem por N.T., em roedores, a partir de diversas células somáticas.

Eficiência da clonagem em ratinhos por N.T. a partir de células somáticas (in Mullins, L. J. et alii, 2003)

Célula dadora de núcleo	% de blastocistos produzidos	% de descendência viva gerada
Embrião de duas células	29	10
Embrião de quatro células	22	6
Embrião de quatro células	83	57
Embrião de oito células	17	3
Cumulus	-	2
Cumulus N.T. + activação imediata	30-345	2-3
Cumulus N.T. + activação 1-3 horas	42-61	1-3
Fibroblasto fetal (N.T. em serie)	30	1-3
Córtex cerebral fetal	-	5,5

Nos ratinhos a reprogramação dos núcleos embriónicos parece ser restringida após a activação do genoma embriónico que ocorre na etapa das duas células e dai a baixa eficácia da N.T., a partir de células adultas, no ratinho.

3.2 - EFICÁCIA DA CLONAGEM POR N.T. DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM DIVERSAS ESPÉCIES ANIMAIS

Dado o seu inegável interesse, visto permitir, independentemente das espécies animais, tipo de células dadoras de núcleo e tecnologias utilizadas, averiguar da baixa eficácia da clonagem por N.T. transcrevemos no quadro seguinte os dados compilados por Lesley Paterson (Scientific Secretary to Ian Wilmut, Gene Expression and Development, Roslin Institute, July 2002) sobre a eficiência da clonagem por N.T. de células somáticas em diversas espécies animais.

Estes dados resumem os elementos colhidos nas cinquenta referências bibliográficas trabalhadas por Lesley Paterson, e que até julho de 2002 abordavam esta matéria.

Atende-se a diversas características tais como a idade das células dadoras de núcleo, o seu tipo, a percentagem de embriões formados a partir dos oócitos N.T., o número de gestações produzidas

(inclusive com o número total de recipientes), o número de gestações perdidas, o número de nado vivos (inclusive a percentagem de embriões totais transferidos), o número de sobreviventes e a eficácia da clonagem, ou seja, o número de animais vivos expressos como a percentagem do número total de oócitos N.T.

No quadro em apreço e no caso dos ratinhos, as duas colunas referentes ao número de gestações (número de recipientes) e ao número de gestações perdidas no bovinos, suínos, ovinos, caprinos, gatos e coelhos, são substituídas por uma única coluna correspondente ao número de implantações, revelando quantos fetos foram implantados nos úteros mas que eram subsequentemente reabsorvidos.

Eficкncia da clonagem por N.T. de сйlulas somбticas

Espécie animal	Tipo de doador	Tipo celular	% de reprogramação	Nº de oócitos reconstruídos (% de implantações)	Nº de implantações perdidas	Nº de embriões	Nº de fetos vivos	Eficкncia da clonagem %	Ref.
Bovina	Adulta	Cumulus	39,4%	3 (3)	0	5 (83,3%)	2	5,0%	11
				6 (34)	3	3 (7,3%)	3	0,9%	12
		Oviduto	39.3 %	2 (2)	0	3 (75%)	2	2,0%	11
				4 (14)	2	2 (11,8%)	2	0,8%	12
		Uterina		3 (7)	2	2 (14,2%)	0	2,0%	12
		Granulosa	69,4%			10 (10%)	10	1,8%	13
						2 (2,7%)	1	0,5%	14
			16,0%	31 (91)	23	9	8	0,7%	15
		Glмmбria	16,1%	2 (2)	1	1 (25%)	1	0,4%	16
			16,8%	4 (31)	2	2 (4,4%)	2	0,7%	17
		Muscular	14,2%	8 (20)	4	4 (15,3%)	1	0,8%	18
		Fibroblasto	53,3%	5 (12)	4	1 (6,25%)	0	1,1%	16
				1 (5)	0	1 (16,7%)	0	0,6%	19
			11,9%	15 (36)	9	6 (7,4%)	4	0,5%	20
			16,5%	6 (11)	5	1 (3,8%)	1	0,3%	21
				24 (48)	12	12 (20,3%)	4	2,8%	12
			31,1%	6 (37)	4	2 (4,6%)	1	0,8%	17
			?	45 (133)	36	9	6	?	22
	Recem nascido	Fibroblasto		5 (13)	3	2 (12,5%)	2	1,1%	12
		Fнgado		4 (8)	2	2 (20%)	1	1,3%	12
		Testiculo		1 (1)	1	0	1	0,0%	12
	Fetal	Fibroblasto	4,6%	17 (22)	11	6 (7,6%)	6	0,3%	23
			22,7%	8 (12)	7	2 (8,7%)	1	0,4%	24
			11,7%	5 (12)	5	0	?	0,0%	21
				2 (6)	1	1 (14.3%)	1	3,8%	12
			27,5%	52 (115)	33	25 (11,3%)	11	0,9%	25
				11 (40)	5	6	5	?	22
				110 (247)	80	30 (6%)	24	?	26
		Germinativa	22,7%	8 (17)	7	1 (3,5%)	0	0,2%	27
		Fнgado		1 (3)	1	0	?	0,0%	12
	Fetal p/ Adulto	Somбtica		535 (2170)	432	106	82	?	28
Sуina	Adulta	Fibroblasto		2 (5)	1	2 (0,9%)	2	0,9%	29
		Granulosa		2 (10)	1	5 (0,8%)	5	0,1%	30
	Recem nascido	Fibroblasto	9,5%	1(5)	0	4 (0,9%)	2		31
	Fetal					1 (0,9%)	1	0,2%	32
				3 (9)	2	1	1	0,1%	32
				5 (10)	3	2 (0,3%)	1	0,2%	34
		Somбtica				4 (0,7%)	4	0,5%	35
Ovina	Adulta	Glмmбria	10,5%	1 (13)	0	1(3,4%)	1	0,4%	36
		Granulosa	30,4%	2 (4)	1	1	1	4,3%	37
			11,9%	31		6 (6,7%)	1	0,6%	38
	Fetal	Fibroblasto	27,3%	5 (16)	2	3 (7,5%)	2	1,7%	36
			13,6%	11 (24)	2	7 (10,4%)	5	1,4%	39
				39 (75)	31	4 (3,3%)	0	?	40
			19,2%	17 (42)	3	14 (17,5%)	3	3,4%	41
Caprina	Adulta	Granulosa		4 (9)		7 (7,3%)	6	?	42
				4 (8)	0	7 (7,7%)	6	7,2%	43
		Cumulus		2 (29)	0	3 (1,3%)	1	0,7%	44
	Fetal	Fibroblasto		1 (6)	0	2 (3,7%)	1	2,1%	43
				5 (13)	0	6 (6,2%	3	1,6%	45
				5 (23)	0	5 (2,2%)	5	0,8%	46
			32,1%	6 (15)	3	5 (13,2%)	5	3,1%	47
		Somбtica				3 (2,7%)	3	1,1%	48
Gato/Coelho	Adulta	Cumulus ou Fibroblasto		2 (8)	1	1	1	?	49
	Adulta	Cumulus		10 (64)	6	6 (0,6%)	4	0,3%	50
Ratinho	Adulta	Cumulus		Numeros de implantaзxes		31 (2,2%)	22	1,3%	1
						86 (2,3%)	80	1,1%	2
			42,1%			7 (23,3%)	4	5,8%	3
						3 (0,7%)	0		4
			46,0%			6 (2%)		0,9%	5
						7 (2,7%)		2,3%	5
			52,8%			9 (5,3%)		2,8%	5
		Firbroblasto				3 (1,1%)	1	0,4%	6
			21,8% *	134		5 (1,7%)	5	0,3%	7
	Recem nascido	Sertoli	23,6% **	235		16 (3,6%)	11	0,9%	8
	Fetal	Firbroblasto	16,4%	73		5 (1,1%)	2	0,2%	9
		Glonadas	55,1%			6 (2,7%)	5	1,5%	2
		Neurais	29,7%			12 (10,3%)	11	3,1%	10

* nЇ de oycitos N.T. exceptp nЇ de oycitos sobreviventes

** nЇ de oycitos cultivados

3.3 - N.T. DE CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIÓNICAS (ES) EM RATINHOS

O embrião se explantado, portanto com os seus tecidos transferidos para um meio artificial, pode originar linhas celulares estaminais embriónicas pluripotentes o que tem sido conseguido por ora a partir de ratinhos e humanos mas não a partir de animais de especies pecuárias.

Estas linhas celulares estaminais embriónicas (ES), como já referimos, derivam das ICM dos blastocistos, sendo pluripotentes e cultiváveis "in vitro" durante muitas passagens, sem a aneuploidia podendo gerar ratinhos quiméricos se injectadas em blastocistos receptores diploides ou tetraploides gerando todos os tecidos embriónicos e fetais.

No quadro seguinte refere-se a eficiência da clonagem em ratinhos por N.T. a partir de células estaminais embriónicas (ES), (in Mullins, L. J. et alii, 2003)

Características

Características da célula ES dadora de núcleo	% de blastocistos produzidos	% de descendência viva gerada
Interfase	28	-
MII	56-70	-
Linha "inbred"	22	1,8
Linha F1	22	3,5
80% de confluencia	49	9
60-70% de confluencia	22	1
Passagem nº 19	47	5
Passagem nº 22	27	0,2

As células estaminais embriónicas das primeiras passagens ou replicações, produzem fetos em melhores condições do que as células estaminais já passadas muitas vezes, podendo observar-se nestes últimos casos diversas anormalidades nos fetos, com mortalidade post-natal (Nagy, A. et alii, 1993) indicando portanto perdas de potencial de desenvolvimento.

Conforme veremos mais tarde (reprogramação), durante a pré-implantação do embrião, a maioria do DNA do genoma, torna-se menos metilado, com os blastocistos com baixas taxas de metilação.

Os níveis fetais de metilação são adquiridos após a implantação do embrião e pela metilação de novo (Kapri, T. et alii 1992). Nos genes "imprinting", cuja expressão depende da origem paterna ou materna, a regulação da metilação é um tanto diferente da ocorrida na pré-implantação.

4 - CLONAGEM DE MAMÍFEROS POR N.T. E EXPRESSÃO DE ALGUNS GENES (WESTHUSIN, M.E., 2003)

Como temos vindo a referir, na clonagem dos mamíferos por N.T., ocorre a transferência de um núcleo de uma célula dadora obtida do animal a ser clonado, para um oócito recipiente a que foram removidos os cromossomas em metafase (núcleo).

O núcleo dador transferido é depois reprogramado em ordem a dirigir o desenvolvimento do novo embrião, geneticamente igual ao da célula dadora desse núcleo. O embrião obtido pode ser transferido para uma mãe adoptiva onde a gestação decorrerá até ao seu termo com o nascimento de um clone.

Como vimos, em geral e independentemente da espécie animal, apenas 1 a 5% dos embriões obtidos por esta forma sobrevivem até ao seu termo.

Está demonstrado (Westhusin, M.E., 2003), que embriões e fetos produzidos por N.T. têm perfis de expressão de genes diferentes dos embriões e fetos normais obtidos por processos naturais.

Em alguns casos, por exemplo o mRNA codificador de IGF-II é super expresso nos blastocistos clonados e subexpresso nos fetos clonados, comparativamente a embriões e fetos obtidos por fertilização normal (Wigner et alii, 2000 in Westhusin, M.E., 2003).

Também os IL-6, FGF-4 e FGFr2 são anormalmente expressos em algumas morulas e blastocistos obtidos por N.T. (Daniels, R. et alii, 2000).

É de admitir que após a N.T. uma reprogramação genética inadequada seja responsável por uma expressão de genes aberrante durante a embriogenése e constitua a principal causa de falhas no seu desenvolvimento.

As condições de cultura dos embriões bovinos pré-implantados condicionam naturalmente a expressão dos seus genes (Wrenzycki, C., 2003)

O perfil da expressão dos genes de embriões pré-implantados murinos e bovinos, é diferente dos embriões produzidos " in vitro" para os embriões derivados "in vivo" tal como se refere no quadro seguinte:

Embriões pré-implantados

Genes	Produzidos "in vitro"	Produzidos "in vivo"
Conexina 43	-	+
b Lif (factor inibidor da leucemia bovina)	+	-
Lif- receptor	+	-
Hsp 70 1 (proteínas de choque térmico)	Reguladas positivamente	Menos reguladas positivamente
Glut-1 (transportador de glucose)	Reguladas negativamente	Menos reguladas negativamente

+ = Positivo
- = Negativo

Aceita-se que alterações persistentes na expressão normal dos genes, sobretudo ao nível das suas metilações, sejam a causa do LOS (Large Offspring Syndrome) que afecta cerca de 1/3 das crias bovinas resultantes das transferência de embriões produzidos "in vitro".

5 - PRODUÇÃO DE BOVINOS CLONADOS POR N.T., TIPOS DE CÉLULAS DADORAS E UM EXEMPLO DE CLONAGEM POR N.T. DE UM BOVINO (FORSBERG, E. J. ET ALII, 2002)

Diversos tipos de células de bovino têm sido utilizados para a N.T. e obtenção de embriões, procurando-se identificar quais os tipos celulares que produzem crias mais saudáveis e que possuem

características de crescimento mais adequadas para suportarem manipulações genéticas como por exemplo de transgénese.

Há considerável variação entre diversos tipos de células obtidas a partir de um mesmo animal, o mesmo sucedendo para o mesmo tipo de células mas obtidas de diversos animais.

Foi possível verificar em N.T. que células fetais em cultura são mais adequadas do que as células adultas para a iniciação da gravidez e produção de crias, com excepção das células cumulus do folículo ovárico.

As células fetais da "genital ridge" (GR) neste estudo (Forsberg, E. J. et alii, 2002) foram as que permitiram mais altas taxas de iniciação da gravidez e de nascimento de crias, bem como melhores caracterÍsticas proliferativas quando cultivadas. Estas células GR cultivadas utilizadas na N.T. e transferencia de embriões, iniciaram gravidezes em 40% das 197 vitelas recipientes e de todas as recipientes 9% geraram vitelos.

Por outro lado as GR cultivadas duplicavam-se 85 vezes ao todo e 75 vezes após diluição para subsequente cultura a partir de uma única célula.

Contudo, células transfectadas (transgénicas) têm uma taxa de iniciação de gravidezes e produção de crias inferior ás observadas em células não transfectadas(22% contra 32% no primeiro caso e 3,4% contra 8,9% no segundo caso).

Os primeiros tipos de células utilizadas para clonagem de mamíferos por N.T. foram retiradas de embriões em pré-implantação (Sims e First, 1994; Willadgen, 1986; Keefer et alii, 1994; Mclaughlin et alii, 1990; Kato e Tsumoda, 1993; Chesne et alii, 1993), mas a pequena quantidade de células obtenível levou ao seu abandono (Peura et al, 2001; Stice e Keefer, 1993) tendo-se passado a utilizar no caso do ratinho células estaminais embriónicas (ES) extraídas sobretudo das células da massa interna do blastocisto o que permitia obter grande número de linhas de células que podiam ser geneticamente modificadas (Tsumoda e Kato, 1993; Stice et al, 1996; First et al, 1994).

Mas se certas linhas de células ES de ratinho permitiam a clonagem desta espécie animal, inclusive tinham capacidade para fazer a integração de transgenes por recombinação homóloga, as células estaminais embriónicas das espécies pecuárias, como os bovinos e suínos, não o têm permitido pelo menos até agora, dada a dificuldade em as propagar (Piedrahita, 2000;Whekler, 1994) e as estabilizar em linhas celulares, e não se modificavam geneticamente por recombinação homóloga.

Um grande avanço nesta matéria consistiu na clonagem da ovelha Dolly (Wilmut et alii 1997) feita a partir de células de epitélio mamário de um animal adulto.

A clonagem de cabras, ratinhos, bovinos, suínos e outras espécies animais têm sido realizadas utilizando para a N.T. células não embriónicas (Baguisi et alii, 1999; Betthauser et alii, 2000; Cibelli et alii, 1998; Kato et alii, 1998; Onishi et alii, 2000; McCreath et alii, 2000; Pace et alii, 2002; polejaeva et alii, 2000;Strelchenko et alii, 1998; Wakayama et alii, 1999; Wells, et alii, 1997, Wells et alii, 1999).

Como já referimos, diversos tipos de células têm sido utilizadas para este efeito, como é o caso de fibroblastos adultos, fibroblastos fetais e células adultas da cumulus ou da granulosa.

Arat, S et alii, 2005 referem ter conseguido clonar embriões de bovino a partir de células dadoras de núcleo provenientes de massas musculares de carcaças de bovino armazenadas a temperaturas de refrigeração (Oº C.) durante 72 horas.

Também as células germinativas embriónicas derivadas de "genital ridges" fetais têm características que lhes permitem a incorporação de transgenes "in vitro" (Piedrahita et alii, 1998; Resnick et alii, 1992; Shamblott et alii, 1999; Surani, 1999; Lavoir et alii, 1994; Lavoir et alii, 1997; Dehaise et alii, 1995; Matsui et alii, 1992) o mesmo sucedendo com fibroblastos fetais ovinos (McCreath et alii, 2000).

5.1 - EXEMPLO SUMÁRIO DE UMA CLONAGEM POR N.T. EM BOVINO (FORSBERG, E. J. ET ALII, 2002)

O isolamento e cultura de células de várias proveniências, por exemplo "genital ridges", tecidos corpóreos fetais (sem incluir cabeça e vísceras) ou pavilhão auricular começa pela remoção asséptica dos tecidos e sua fragmentação com lâminas, em meio adequado contendo uma protease, seguindo-se uma curta incubação de 45 minutos a 37ºC. Seguem-se novas desagregações através de crivos adequados, diluição em meio apropriado e centrifugação.

Uma porção deste sedimento obtido contendo 50.000 – 100.000 células é cultivado em meio de cultura próprio, sobre uma camada de células alimentadoras de ratinho, inactivadas mitoticamente, contida em placas ou frascos para cultura de células contendo um meio de cultura complexo que pode em algumas circunstancias incluir certos factores de crescimento e recombinação.

A cultura é desenvolvida a 37ºC numa atmosfera de ar húmido contendo 5% de CO2 e após 5-7 dias as concentrações dos factores de crescimento e recombinação são reduzidas e após 9-12 dias de cultura são mesmo removidos.

Após as células em cultura confluírem umas com as outras são passadas (distribuídas por novos recipientes com meio de cultura) utilizando processos standard (Forsberg, E. J. et alii, 2002).

Cerca de 100 destas células são depois cultivadas como se referiu atrás.

As células são analisadas na sua morfologia e depois aspiradas as células seleccionadas, por micromanipulação.

Como veremos oportunamente, no caso da transgenése, optimizado o tipo de célula dadora de núcleo e construído o DNA pretendido é realizada a transfecção por electroporação utilizando para o efeito reagentes comerciais adequados e os protocolos de transfecção recomendado pelos fabricantes desses reagentes.

Quanto aos oócitos para células recipientes dos núcleos dadores, são aspirados de ovários colhidos no matadouro e amadurecidos durante a noite em meio adequado contendo hormona luteinizante, num incubador a 38,5ºC num ambiente contendo 5% de CO2.

Após 16-17 horas a camada de células cumulus expande-se e em cerca de 70% dos oócitos são extrudidos os primeiros corpos polares.

Os oócitos são depois desprovidos das células cumulus por agitação em Vortex e a cromatina corada com corante adequado em meio contendo citocatalasina.

A citocatalasina nas células vivas promove o desaparecimento do citoesqueleto de actina inibindo os movimentos da celula.

Os oócitos corados e em suspensão, em gotas do seu meio de manutenção e sob óleo mineral, são depois desprovidos de núcleo através de delicada micromanipulação.

Por outro lado as células dadoras de núcleo isoladas são incubadas numa solução de protease e parecida com aquela que continha os oócitos. Depois são distribuídas numa suspensão que contenha apenas uma célula, sendo esta lavada com o meio anterior e utilizada para N.T. dentro de 2-3 horas.

Uma única célula dadora de núcleo com o tamanho óptimo (12-15µm) é inserida no espaço perivitelino do oócito enucleado, sendo a fusão da membrana plasmática da célula e do oócito promovida pela aplicação de um pulso electrónico de 90v 15µ segundos numa solução adequada contida numa câmara de 500µm.

Segue-se a cultura em meio adequado e os embriões N.T. são depois activados e incubados, lavados e re-incubados e novamente cultivados. Pode seguir-se uma segunda N.T. (reclonagem) após desagregação dos embriões N.T. no estado de mórula e nova clonagem em oócitos por estes blastomeros provenientes das mórulas, seguindo-se nova cultura em meio adequado.

Os embriões de boa qualidade morfológica são transferidos para fêmeas recipientes adequadas. Blastocistos de grau 1 ou 2 (IETS, 1998) podem ser transferidos para recipientes (1 a 3 embriões /recipiente).

6 - CLONAGEM EM CANÍDEOS

A clonagem por N.T. em canídeos, depois de muitas experiências falhadas, veio a ser alcançada recentemente (Lee, B.C. et alii..., 2005) pela equipa de médicos veterinários de W. S. Hwang na Coreia do Sul.

A tecnologia utilizada para se alcançar este êxito nos canídeos baseou-se no conhecimento das dificuldades de maturação dos "oócitos" caninos "in vitro".

A equipa do Prof. Hwang promoveu a maturação "in vivo" dos oócitos obtidos.

Como já referimos o sucesso das clonagens por N.T. a partir de células somáticas (SCNT) depende da qualidade, disponibilidade e maturação dos oócitos não fertilizados.

Sucede que ao contrário dos outros mamíferos, nos canídeos a ovulação ocorre primeira profase meiótica, amadurecendo depois os oócitos dois a três dias na regiões distais do oviduto (Lee, B. C. et alii, 2005).

Nas experiências do Prof. Hwang os oócitos maturados "in vivo" na metafase II após 72 horas post ovulação, eram recolhidos por irrigação (flushing) dos ovidutos.

As células dadoras dos núcleos foram fibroblastos obtidos por biopsia da pele do pavilhão auricular de um galgo macho afegão e que foram cultivadas com 2 a 5 passagens (com transferência das células em pleno desenvolvimento para novo recipiente com o meio de cultura adequado (Lee, B. C. et alii, 2005)).

Os oócitos não fertilizados eram enucleados por micromanipulação, e uma única célula dadora transferida para cada oócito enucleado. Seguia-se a fusão do par e após esta ocorrer a activação.

Depois os oócitos activados eram transferidos para os ovidutos ou cornos uterinos de recipientes adequadas em momentos apropriados das fases de desenvolvimento dos embriões.

Foram colhidos de cada cadela cerca de 12 oócitos, tendo sido construídos 1.095 embriões caninos que foram transferidos para 123 cadelas, tendo as gestações sido confirmadas por ultrasonografia.

A gravidez só se verificou quando a transferência de embriões ocorria antes das 4 horas, após a activação dos oócitos o que parece ser crucial para o êxito da clonagem.

Apenas dois fetos chegaram a termo, e os dois cães que resultaram das 123 cadelas recipientes representam apenas uma eficiência de 1,6% o que é considerado muito pouco face aos resultados alcançados por exemplo em gatos e cavalos (Shin et alii, 2002; Galli et alii, 2003).

Um dos cães clonados sobreviveu e o outro morreu aos 22 dias em consequência de uma pneumonia de aspiração mas sem anomalias anatómicas observáveis, post mortem.

Aguarda-se que no futuro se consigam obter linhas de células estaminais embriónicas de canídeos que permitam encarar clonagens terapêuticas.

7 - CLONAGEM DE GATOS "FELIS DOMESTICUS" (SHIN, T. ET ALII, 2002)

Experiências em 2002 de clonagem por N.T. em gatos tendo como células dadoras de núcleo, fibroblastos adultos, não permitiram gerar animais vivos (Shin, T. et alii, 2002). Esses fibroblastos adultos eram isolados a partir da mucosa oral de um gato adulto macho, passados 3 a 7 vezes em cultura , sendo essas células congeladas e armazenadas em azoto líquido e depois descongeladas e fundidas com óvulos de gata amadurecidos "in vitro". Estes oócitos eram enucleados por micromanipulação quando em metafase e depois transferidos para fêmeas recipientes sincronizadas.

Este objectivo já foi no entanto conseguido utilizando como células dadoras do núcleo para a N.T. células cumulus em cultura primária, obtidas de uma fêmea adulta.

Comprovou-se o êxito do clone obtido através dos seguintes parâmetros:
- Análise do DNA das células cumulus para a N.T.
- Análise do DNA dos leucócitos do sangue do animal dador de núcleo
- Análise do DNA dos leucócitos do sangue da mãe de aluguer
- Análise do DNA do esfregão swab oral do gatinho clonado
- Análise do DNA da amostra de controlo de outro felídeo e comparação com bases de dados genéticos de gatos
- Análise de 7 loci microsatelites específicos não ligados altamente polimórficos de felídeos.

Todos estes parâmetros confirmaram que o gatinho clonado era um clone.

A coloração da pelagem do gatinho clonado, como sucede com outros animais idênticos geneticamente mas com pigmentações de diversas cores, não é exactamente a mesma do animal dador do

núcleo, pois a pigmentação múltipla e variada dos animais deve-se não só a factores genéticos mas também a factores de desenvolvimento que não são controlados pelo genotipo.

Curiosamente, experiências efectuadas já em 2005 pela equipa do Prof. W. S. Hwang na Coreia do Sul (Yin, W. J. et alii, 2005) já permitiram fazer a clonagem de gatos por N.T. a partir de células somáticas fibroblásticas fetais e adultas da pele, como dadoras de núcleo.

Os oócitos nestas experiências foram obtidos a partir da desintegração de ovários em meio Hepes-tamponado TCM 199 e seleccionando os complexos cumulus oócito (COC) com massa de células cumulus compacta e cor escura. O ooplasma homogéneo era cultivado e maturado em meio TCM 199 + 10% de soro bovino fetal durante 12 horas.

Os genótipos de animais clonados eram idênticos aos das linhas celulares dadoras de núcleo.

A clonagem reprodutiva alcançada em gatos já está no domínio da exploração comercial na medida em que nos U.S.A. a empresa Genetic Saving & Clone, Inc. se propõe fazer clonagens de gatos a pedido dos donos dos animais a clonar e com o dispêndio de mais ou menos 32 000 dólares U.S.A estabelecendo para o efeito o seguinte calendário:

	Tempo necessário
Pet Banking	21 dias
Produção de embriões	14 dias
Gestação	65 dias
Desmama	60 dias
Total	160 dias

Se no futuro for possível estabelecer linhas celulares estaminais embriónicas a partir de N.T. em gatos será possível antever promissoras clonagens terapêuticas nesta espécie animal, feitas a partir de células do próprio animal doente e com riscos mínimos ou ausentes no que se refere a histocompatibilidade. Será um novo tipo de desempenho na clínica destes animais de companhia.

Escusado será dizer que a utilização de equivalentes práticas biotecnológicas em canídeos e noutras espécies animais revolucionará a prática da clínica veterinária.

Dado o seu interesse, e para efeitos puramente informativos, salientamos seguidamente as principais etapas utilizadas na clonagem de gatos (Shin, T. et alii, 2002), quanto aos seguintes aspectos:

1º Recuperação de oócito e sua maturação "in vitro"
2º Enucleação
3º Cultura de células e preparação de células dadoras
4º Transplante de núcleos (N.T.), electrofusão e activação de oócitos
5º Sincronização das fêmeas recipientes e transplante de embriões

1º RECUPERAÇÃO DE OÓCITO E SUA MATURAÇÃO "IN VITRO"

Foram recolhidos, em clínicas veterinárias, por ovariohisterectomia de rotina tractos reprodutivos de fêmeas normais com mais de 6 meses, sendo os ovários retirados e lavados com meio adequado e fragmentados e seccionados com bisturis em ordem a libertar os óvulos maternos.

Estes óvulos eram depois maturados "in vitro" através de cultura em meio complexo (TCM 199 da Sigma) suplementados e incubados numa atmosfera própria a 38ºC.

2º ENUCLEAÇÃO

Após a maturação "in vitro", os óvulos eram desprovidos das células cumulus que os envolvem, através de pipetagens vigorosas durante 3 minutos num meio tamponado suplementado com hialuronidase, após o que os oócitos eram colocados em placas de Petri contendo um meio tamponado suplementado inclusive com citocatalasina (esta droga, como já referimos, despolimeriza o citoesqueleto de actina e inibe os movimentos do oócito) e sendo enucleados com a ajuda de uma pipeta de vidro chanfrada montada num micromanipulador, estando a operação a ser conduzida num microscópio adequado.

A eficácia da enucleação era controlada por observação em luz ultravioleta.

3º CULTURA DE CÉLULAS E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DADORAS DE NÚCLEO PARA N.T.

Como é sabido, a eficiência das células para este efeito é variável consoante o tipo de células utilizadas.

Obtenção de fibroblastos adultos - Colhidos por biopsia da mucosa oral de gato adulto macho, são cultivados em meio de cultura complexo suplementado e incubados. Após 3 a 7 passagens são recolhidos, congelados e guardados em azoto líquido, sendo depois antes da N.T. (3 a 5 dias antes) descongelados e mantidos em determinadas condições.

Obtenção de células cumulus – Era feita a partir de culturas primárias de células cumulus recolhidas de gatas adultas preparadas antecipadamente. Assim eram administradas ás gatas por via intramuscular 150-200 IU de pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sigma- Aldrich, St Louis) e passadas 75-84 horas injecção de human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon, Intervet Inc., Millsboro, DE).

48 horas após esta última injecção os ovidutos das gatas tratadas eram fluidificados (flushing) com meio adequado sendo os óvulos não fertilizados recolhidos cirurgicamente.

Os óvulos eram colectados a partir deste líquido de lavagem com a ajuda de um estereomicroscópio. As células cumulus eram separadas do ovulo por pipetagens vigorosas em meio adequado suplementado com hialuronidase, sendo depois colocadas noutro meio, lavadas por centrifugação e colocadas em meio apropriado para serem cultivadas durante cerca cinco dias a 37ºc numa atmosfera controlada.

4º TRANSPLANTE DE NÚCLEO (N.T.), ELECTROFUSÃO E ACTIVAÇÃO DO OÓCITO

As células anteriores dadoras de núcleo eram tripsinizadas e colocadas em placas de Petri contendo um meio adequado, sendo depois micromanipuladas em ordem a ter uma única célula dadora de núcleo para ser introduzida no interior do espaço perivitelino do óvulo enucleado.

A dupla célula dadora/óvulo enucleado, é equilibrada numa solução adequada e é transferida para uma câmara de electrofusão com a mesma solução, sendo a fusão das duas células introduzida pela aplicação de 2, 3.0 KV/cm 25µsec DC pulses, gerado por um aparelho próprio.

A dupla fundida é retirada da câmara de electrofusão e incubada em meio e condições próprias e passadas duas horas são retiradas desta incubação e novamente equilibradas na solução adequada, colocadas novamente numa câmara de fusão contendo o mesmo meio e aplicada nova electrofusão com 2x, 1,0 KV/cm 50µsec pulses, 5 segundos.

O ovulo clonado é depois removido da câmara de fusão, lavado e incubado em condições complexas num meio suplementado com um inibidor de síntese proteica.

Os embriões clonados são depois cultivados num meio de cultura suplementada, durante 1 a 3 dias.

5º SINCRONIZAÇÃO DAS FÊMEAS RECIPIENTES E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A sincronização do estrus nas gatas recipientes do embrião a transferir, era alcançada com o protocolo de tratamento hormonal indicado em 3º na obtenção de células cumulus.

Os embriões clonados referidos em 4º eram transferidos cirurgicamente para o oviduto das gatas recipientes.

As gestações eram acompanhadas por ultrasonografia transabdominal.

8 - CLONAGEM DE SOLIPEDES

A clonagem de equinos depara com a dificuldade da falta de optimização da maturação de oócitos "in vitro" (Woods, G. L. et alii, 2003) e dos sistemas de cultura dos embriões.

A activação de oócitos em muitos animais parece estar associada com as concentrações intracelulares de cálcio (Kline, 1992). Por exemplo, o perfil de cálcio intracelular nos oócitos de equinos é inferior ao da dos oócitos de bovinos.

As concentrações de cálcio nestas biotecnologias de clonagem para obtenção de uma muar foram aumentadas nos meios utilizados para cultura "in vitro" e manipulação (Woods, G. L. et alii, 2003), tendo sido conseguidos por estes autores em 2003 a clonagem por N.T. de uma muar a partir de células fetais.

Para isso foi estabelecida uma linha celular de fibroblastos a partir de um feto de muar.

Os oócitos foram obtidos de uma égua através de uma aspiração transvaginal guiada por ultrasons e tratados com hialuronidase para remoção das células cumulus.

Apenas os embriões mantidos e activados em meio com elevadas concentrações de cálcio (3 vezes e 6 vezes) originaram gestações e no nascimento de uma muar macho de termo.

Woods, G. L. et alii, 2003 referem, que o núcleo das células de muares, pode dirigir o desenvolvimento completo embriónico e fetal e que os oócitos de equídeos mantidos nas condições que indicam podem reprogramar os núcleos das células somáticas equinas originando desenvolvimento fetal até ao seu termo.

Galli, C. et alii, 2003 referem ter clonado um poldro a partir de um animal adulto, no caso a própria égua que serviu de mãe de aluguer foi a dadora de núcleo para N.T.

As linhas celulares foram obtidas de fibroblastos equinos por biopsia da pele.

Os oócitos foram obtidos por maturação "in vitro" de oócitos foliculares recuperados de ovários equinos colhidos em matadouros.

Os embriões eram reconstituídos por fusão celular com fibroblastos e apenas os embriões fundidos eram activados e cultivados "in vitro" até ao estado de blastocisto, sendo estes transferidos para éguas recipientes por meios não cirúrgicos.

9 - CLONAGEM DE RATAZANAS (RATTUS NORVEGICUS)

As ratazanas são animais experimentais de muito interesse para diversíssimos estudos no âmbito das patologias humanas e animais.

No entanto, a obtenção de linhas celulares estaminais embriónicas (ES) nestes animais não tem sido alcançada ao contrário do que sucede nos ratinhos, o que tem criado enormes dificuldades em certo tipo de estudos das patologias comparadas, na medida em que as ratazanas são animais de eleição e com muitas vantagens para determinadas investigações relativamente aos ratinhos e a outras espécies animais.

Por outro lado e apesar de se conhecer há relativamente pouco tempo todo o genoma destas duas espécies animais (ratinhos e ratazanas) a produção e obtenção de mutações pontuais (targeted mutations) nas ratazanas não tem sido conseguida dada a indisponibilidade de linhas ES para esse efeito. Situação de resto comum com outras espécies animais.

No entanto, tal como já referimos, após a construção da ovelha Dolly com as tecnologias para clonagem a partir do transplante de núcleos de células somáticas (SCNT) esta situação modificou-se passando a ser possível alcançar clonagens em diversas espécies animais, mais facilmente numas espécies que noutras.

No caso das ratazanas, apenas em 2003, Qi Zhou e col. alcançaram este objectivo e como vimos anteriormente nos gatos, cavalos e muar, isto foi conseguido algum tempo antes e nos canídeos apenas em 2005.

No caso das ratazanas foi gerada descendência fértil clonada, através da regulação da activação dos oócitos (Zhou, Q. Et alii, 2003).

Com efeito referem Qi Zhou et col. neste trabalho que a coordenação finamente regulada entre a transferência de núcleo e o momento da activação do oócito é crítica para o êxito da clonagem.

Na ratazana esta coordenação está dificultada pelo facto de quase todos os oócitos se activarem espontaneamente, "although abortively" dentro de 60 minutos após a sua remoção dos ovidutos (Zernicka – Goetz, 1991).

Esta situação de tão rápida e incompleta activação dos oócitos não ocorre noutras espécies animais, que têm sido clonadas por N.T. (Zhou, Q. et alii, 2003).

Para se alcançar êxito nas clonagens torna-se necessário adoptar e processo de SCNT à fisiologia do oócito.

A activação dos oócitos é travada pela inactivação do factor promotor da maturação (MPF) através de uma via de degradação proteosómica mediada por ciclinas.

Em termos práticos o desenvolvimento da activação dos oócitos evidencia-se ao nível do oócito pela formação de uma marcada produção de citoplasma. Em oócitos mantidos em condições standard evidenciam-se dois conjuntos separados de cromatídios, mas se estiverem num meio adicionado de MG 132, que é um inibidor de proteases, observa-se uma placa apenas de metafase estabilizada.

No trabalho de Q. Zhou e col. refere-se que para alcançar este último efeito os investigadores utilizaram o MG 132 que é um inibidor de proteases que bloqueia reversivelmente a primeira transição metafase – anáfase da meiose na ratazana (Josefsberg, et alii, 2000) estabilizando reversivelmente a maioria das metafase MII do oócito até ás 3 horas.

Para clonagem com êxito de ratazanas e obtenção de descendência viável, torna-se necessário recolher os oócitos na prevenção de MG 132 nas condições descritas (material e métodos in Zhou, Q. et alii, 2003) e realizar a SCNT a partir de fibroblastos fetais em cultura sincronizada, dentro de 30 minutos após a remoção da droga MG 132.

10 - CLONAGEM DE COELHOS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

A clonagem de coelhos tem sido conseguida pela N.T. de células somáticas (SCNT) mas apenas a partir de células cumulus frescas e não cultivadas (Chesne et alii 2002 Nat. Biotechnol. 20, 366-369 in Yang, F. et alii, 2005).

Mas quando se pretende ir mais além da simples clonagem, como por exemplo para a transgénese, as células dadoras de núcleo necessitam ser cultivadas e modificadas geneticamente antes de transplantadas.

Yang, F. at col. 2005 referem ter conseguido, com metodologias que descrevem, utilizar células cumulus e fibroblastos cultivados como dadores para a SCNT com êxito, mas com uma eficiência muito baixa, qualquer que fosse o tipo de células cultivadas e utilizadas.

11 - CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEOS (N.T.) ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS

Este tipo de estudos constitui um meio para averiguar das interacções entre o citoplasma de uma célula de uma dada espécie animal com o núcleo de uma célula dadora de outra espécie animal o que pode ter interesse, por exemplo, na conservação de espécies em risco de extinção.

Numchaisrika, P. et alii, 2005 estudaram a hipótese de desenvolver “in vitro” um embrião clonado de elefante asiático utilizando como célula receptora um oócito de coelha, sendo as células dadoras de núcleo obtidas da pele do pavilhão auricular de um elefante asiático (Elephus maximus) recém nascido.

As metodologias descritas neste trabalho permitiram obter a fusão das células somáticas de elefante com o ooplasma de coelha, podendo os oócitos de coelha servir como receptores para suportar o desenvolvimento de embriões de elefante clonados, até à etapa de “blastocisto”.

Noutra experiência (Sansinéma, M. et alii, 2005) utilizaram citoplastos de bovino como possível receptor da transferência de núcleos a partir de células somáticas de outras espécies (i SCNT) admitindo que possam esses citoplastos servir como recipientes universais para aplicações na conservação de espécies exóticas. Contudo neste mesmo estudo foi verificado " in vitro" que o desenvolvimento destas metodologias não resultava, admitindo-se que a interacção inter mitocondrial entre células dadora e receptora possa ser responsável por este bloqueio observado.

Noutros estudos com Yak (Poephagus Mutus) (Su, L. et alii 2005) foi tentada a clonagem de fibroblastos da pele de yak fêmea de 5 anos em citoplastos recipientes de bovino (Bos taurus). Os resultados obtidos sugerem que os oócitos de bovino possuem capacidade para programar e reactivar o genoma de núcleos de células somáticas diferenciadas de yak.

12 - PERSPECTIVAS NA CLONAGEM TERAPÊUTICA

Muitas situações patológicas dependem de alterações num único tipo de células. Sendo estas substituíveis por células estaminais, células progenitoras ou células diferenciadas "in vitro", é possível desencadear terapêuticas que não provoquem reacções imunológicas adversas desde que se gerem blastocistos por N.T. a partir do núcleo de células somáticas do próprio doente, blastocistos que fornecerão para transplantação as células estaminais embriónicas diferenciadas e autólogas para terapêuticas do doente (clonagem terapêutica).

É possível extrapolando, antever para um futuro próximo a clonagem terapêutica eficiente em situações patológicas que se podem estender sobretudo aos animais de companhia depois de estudos subsequentes que esclareçam muitos dos problemas pendentes neste contexto, passando não só pela obtenção de clones celulares funcionais e compatíveis com o recipiente, mas também com um grau de pureza celular que afaste reacções indesejáveis.

Se a partir dos próprios doentes humanos, forem isoladas células somáticas adultas que forem dadoras de núcleo para clonagem de oócitos dos blastocistos resultantes, forem obtidas linhas de células estaminais embriónicas que revelem genomas idênticos aos das células dadoras de núcleo, assim como, histocompatibilidade será dado um passo extraordinário em frente neste domínio.

Isto sobretudo se as clonagens forem obtidas com êxitos percentuais muito interessantes, revelando técnicas de isolamento de células dadoras de núcleo e sua manipulação até à introdução em oócito recolhido e seu desenvolvimento, muito correctas e muito superiores àquilo a que se está habituado neste tipo de clonagem.

No entanto, a extrapolação destas resultados para aplicações clínicas não está por ora nos horizontes dos investigadores.

Por outro lado, a extrapolação para a possível clonagem terapêutica em animais domésticos, esbarra ainda na barreira de não se ter conseguido por enquanto o isolamento de linhas celulares estaminais embriónicas viáveis nestes animais.

No entanto, como teremos oportunamente de abordar mais adiante noutro tema, quando tratarmos de linhas e linhagens de células animais, estaminais, progenitoras e células com outros graus de diferenciação, têm sido alcançados alguns êxitos terapêuticos em diversas espécies animais, a partir de variados tipos de células.

13 - A CLONAGEM E A PERFORMANCE DOS ANIMAIS

Será o melhoramento das raças de animais de basear nas estratégias à base da clonagem, sendo de considerar como obsoletos os métodos tradicionais de melhoramento animal?

A esta questão colocada por Van Vleck em 1999 responde ele interrogando-se sobre.... "como deve ser definido um animal óptimo e se esta definição deve ser mudada consoante o tempo, o local e as exigências do mercado". E avança de seguida, antes de responder a esta pergunta, que antes de lançar a clonagem como método de melhoramento genético é necessário saber se um animal é perfeito devido ao seu fenótipo ou ao seu genótipo.

A clonagem na melhor das hipóteses, e segundo este autor Van Vleck, é mais um dos métodos de melhoramento animal a juntar a tantos outros como a inseminação artificial, a sexagem do sémen a ovulação múltipla, a transferência de embriões sexagem de embriões e fertilização "in vitro". No entanto, admite a longo termo que a utilização da clonagem necessita ser mais aprofundada sobretudo para ser mais eficiente no melhoramento das características quantitativas das produções animais.

Por ora, a clonagem dos animais das espécies pecuárias pode ser feita com a finalidade hipotética de transmitir características hereditárias vantajosas de índole produtiva, provenientes de animais reportados como superiores à média, ou visando a obtenção de descendência por essa clonagem em tempo relativamente mais curto do que através de reprodução normal.

No entanto, como teremos oportunidade de ver mais adiante, em relação à produção de leite em vacas Holstein, as coisas não parecem passar-se desta forma (Norman, H. D. et alii, 2004).

Por outro lado, os bovinos clonados aparentemente saudáveis não podem ser considerados animais fisiologicamente normais (Chavatte-Palmer, D. et alii, 2002) pelo menos até aos 50 dias de idade .

No entanto, Cindy Tian et alii, 2005, referem quanto à adequação para o consumo público, que a carne e o leite de bovinos clonados em mais de 100 parâmetros estudados, relativamente a testemunhas adequadas, não são estatisticamente diferentes e encontram-se dentro dos valores considerados normais.

Poderá pois admitir-se, que a clonagem de espécies pecuárias com a finalidade de melhores performances das produções animais, não é por ora vantajosa.

Poder-se-à no entanto, vislumbrar outra frente de utilidade, com a utilização da clonagem por N.T. para a obtenção de animais transgénicos e aqui as perspectivas podem ser outras e talvez mais amplas, já havendo alguns exemplos palpáveis.

Nas tecnologias para clonagem dos animais, o fraccionamento de embriões (ETS) (Willadsen, S. M., 1987 ref. in Norman H. D. et alii, 2004) e a transferência de núcleo (ETN) a partir de embriões (Robl, J. M et alii, 1987 ref. in Norman H. D. et alii, 2004) foram introduzidas para produção de bovinos leiteiros nos anos de 1980 (Norman H. D. et alii, 2004).

No fraccionamento dos embriões, o embrião extraído de um animal dador, é seccionado cirurgicamente (habitualmente em dois segmentos ou quatro) e os semi-embriões transferidos para animais recipientes com os ciclos reprodutivos sincronizados com os do animal dador.

Em fins de 1987, Robl, et alii, referiram como produzir diversos animais a partir de um único embrião, através da transferência de núcleos (ETN). O embrião dador era colhido e o núcleo de cada

célula deste era transferido para outra célula recipiente, a que tinha sido retirado o núcleo e o embrião gerado por esta célula com o núcleo transferido era por sua vez, transferido para um animal recipiente onde gerava um animal diferente, podendo assim obter-se uma família de clones.

No caso dos animais clonados por ETN, levantou-se a questão de se os genótipos de uma família de clones seriam idênticos, dado que embora o DNA nuclear fosse idêntico o DNA mitocondrial diferia. Esta questão continua hoje a ser profundamente investigada e debatida.

Nos U.S.A. a Associação Holstein (Brattleboro, V.T.) registou os primeiros bovinos clonados por fraccionamento de embriões em 1982, e por transferência de núcleo em 1989, o que originou grande excitação na indústria, pois admitia-se que os animais seleccionados para serem clonados possuiriam um mérito genético superior que se transmitiria à descendência (Norman, H. D. et alii, 2004).

O número de animais clonados por ETS registado no Holstein Association nos U.S.A. aumentou de 4 em 1982 para 246 em 1985, mas depois nos anos seguintes declinou significativamente, sobretudo para os machos, e o mesmo se passou com os animais clonados por ETN de 1988 até 2002.

As produções leiteiras destes animais clonados por ETS e ETN foram ligeiramente mais baixas do que nos animais não clonados utilizados como testemunhas, embora a composição do leite (gordura e proteína) fosse sensivelmente idêntica à das testemunhas.

Também a ontogenia dos bovinos clonados para lactação tem sido averiguada (Pace, M. M. et alii, 2002).

Neste estudo bovinos foram clonados por N.T. derivados de linhas celulares não embriónicas distintas, (34) entre Janeiro de 1998 e Fevereiro de 2000. Cerca de 25% (535/2170) de animais recipientes que receberam os embriões reconstruídos iniciaram gestações, e destas 19,8% (106/535) originaram nados vivos, sucedendo que 77% (82/106) destes bovinos clonados subsistiram saudáveis e produtivos até à data de publicação do trabalho (Dezembro de 2001).

Apesar de grandes diferenças no seu peso à nascença, as suas velocidades de crescimento, performance reprodutiva e características de lactação são semelhantes aquelas de bovinos leiteiros não clonados testemunhas.

Estão assinalados (Miyashita, N. et alii, 2002), notórias diferenças nos comprimentos dos telomeros entre bovinos clonados a partir de diversos tipos de células, musculares, oviduto, mamárias e da pele do pavilhão auricular, utilizando o "Southern blot" como método de análise.

Os comprimentos dos telomeros em bovinos clonados por N.T. de células musculares de um touro velho eram mais compridos do que no animal dador, embora dentro dos limites de variação nos animais normais.

Sucedeu o contrário quando os dadores de núcleo foram as células do oviduto e epiteliais mamárias de vaca velha.

Também bovinos clonados a partir de células embriónicas, tal como a sua descendência, revelaram telomeros mais longos do que os controlos da mesma idade.

Parece pois, aceitar-se que a clonagem em si não restaura o relógio telomerico, mas talvez se possa sugerir que a N.T. pode desencadear um alongamento do telomero consoante o tipo de células dadoras.

Também, como já referimos anteriormente, (Chavatte-Palmer, P. et alii, 2002) vitelos obtidos por clonagem por N.T. (a partir de células somáticas) embora aparentemente saudáveis não podem ser considerados fisiologicamente normais pelo menos até aos 50 dias de idade, atendendo aos seguintes parâmetros estudados: peso dos animais, temperaturas, factores hematológicos e bioquímicos, concentração de IGF-I e IGF- II, IGFBP, GH, insulina, glucose, leptina, T4 e cortisol.

No que se refere aos suínos (Martin, M. et alii, 2004) também as performances de animais clonados por N.T. (a partir de fibroblastos fetais) em relação a animais não clonados, tem sido averiguada. O tempo de gestação média, o tamanho das ninhadas, o peso à nascença e a desmama de machos e fêmeas foram semelhantes dos animais clonados para os não clonados, tal como secedeu com as proporções de nado vivos e sobreviventes à desmama.

Também quanto à performance reprodutiva de touros clonados (Tecirlioglu, R.T. et alii 2005) em três touros clonados por SCNT foi comparada a qualidade do seu sémen com o do sémen de dois touros dadores. Foi examinado o volume do ejaculado, a concentração de esperma e a mobilidade característica do sémen congelado/descongelado, bem como a capacidade de fertilização de cada sémen. A performance reprodutiva ("in vitro" e "in vivo") foi semelhante nos dois grupos de animais testados.

Clonagem em série por transferência de núcleos a partir de células somáticas em touros, podem permitir uma selecção de machos para reprodução em mais curto espaço de tempo e mais barata do que os processos tradicionais, apesar das baixas eficiências da clonagem e das altas taxas de mortalidade fetal e de recém-nascidos .

Kubota, C. et alii, 2004, referem que em clonagens em série em touros, os clones da primeira e segunda geração pareciam saudáveis e possuíam comprimentos normais dos respectivos telomeros, mas não conseguiram produzir clones de terceira geração, o que leva a admitir que de geração em geração se torna cada vez mais difícil a clonagem, o que permite especular ser impossível conferir imortalidade genética ao DNA individual através de clonagens em série.

14 - LARGE OFFSPRING SYNDROME (LOS) NOS ANIMAIS

Embriões de bovinos e ovinos expostos a uma série de ambientes não habituais, como por exemplo, tecnologias de produção de embriões "in vitro" antes da etapa de blastocisto, originam descendência invulgarmente desenvolvida, com grande peso à nascença e com uma série de defeitos orgânicos, passando por gestações prolongadas, trabalhos de parto muito difíceis (distócias), perdas fetais e neonatais, constituindo aquilo que se designa por LOS -Large Offspring Syndrome (Young, L.E. et alii, 1998).

Este conjunto de circunstâncias tem limitado a transferência destas modernas tecnologias reprodutivas, como a produção de embriões "in vitro" ou por N.T., para a prática agrícola e biotecnológica.

A cultura de embriões "in vitro", a transferência assincrona de embriões para ambientes uterinos "avançados" a transferência nuclear (N.T.) e exposição materna a dietas com altos níveis de ureia, estão implicadas no aparecimento deste síndroma LOS.

A produção "in vitro" dos embriões bovinos aumenta a incidência de anormalidades cromossomais, tal como perturba o metabolismo embriónico ao nível da glucose, lípidos, lactato, piruvato e ácidos aminados, relativamente aos embriões "in vivo" (Thompson, J. G., 1997).

Nos embriões de ratinhos produzidos "in vitro" (tal como nos humanos) não está assinalado o síndroma LOS que referimos anteriormente, nem nos suínos, coelhos e hamster, nem nos ratinhos de N.T. (Young, L.E. et alii, 1998).

O aspecto mais saliente do síndroma LOS é o grande tamanho à nascença dos animais (por vezes o dobro do normal), apesar de na gestação dos ovinos ser detectado um superdesenvolvimento do feto já aos 21 dias (ref. Young et alii, in Young, L.E. et alii, 1998).

As distócias estão associadas com os tamanhos exagerados dos animais à nascença, e a gestações são frequentemente mais prolongadas, podendo ainda surgir dificuldades respiratórias, e na sucção do leite ou ainda morte pre-natal súbita (ref. Walker et alii, 1998 e Garry, et alii, 1998 in Young, L.E. et alii, 1998).

Por outro lado nos vitelos clonados sugere-se que o metabolismo energético alterado pode ser a causa da fraqueza após o nascimento e mortalidade. No momento do nascimento alguns destes vitelos revelam hipotermia, hipoglicemia e alguns ainda acidez metabólica severa e hipoxia. Também estão assinalados nestes animais ao nascer, concentrações de glucagon correlacionadas com o peso à nascença dos animais (Young, L.E. et alii, 1998).

Também alterações grosseiras em diversos órgãos estão assinaladas nestes animais LOS, tais como aumento das massas musculares, alterações da composição em fibras de tecido muscular, displasias cerebelar e conformação anormal do esqueleto e da face.

No entanto, a incidência de LOS, após a manipulação dos embriões varia entre 0 e quase 100%.

As tecnologias de clonagem têm evoluído e ao mesmo tempo têm revelado a ocorrência do síndroma LOS após transferência de núcleos (N.T.) de células adultas ou fetais em cultura (ref. Wilmut et alii, 1997, b. e Schinietke, et alii, 1997 in Young, L.E. et alii, 1998).

15 - ALGUMAS PERSPECTIVAS DA CLONAGEM POR N.T. DOS ANIMAIS

As características produtivas dos animais, numa perspectiva de produção animal, parecem corresponder à expressão de diversíssimos genes que intervêm em cada uma das facetas produtivas dos animais (carne, leite, lãs, ovos, etc).

Isto parece desde já apontar para a dificuldade de introduzir modificações genéticas correspondentes a cada um desses conjuntos de genes.

Nestas circunstâncias a simples clonagem, sem a introdução de modificações genéticas dos animais com as melhores características de produção animal, parece por ora o único caminho disponível.

Veremos adiante, quando desenvolvermos o tema da transgénese, que no caso dos peixes e mariscos as coisas parecem não ser bem assim, pois a introdução, por exemplo, apenas do gene da hormona de crescimento nesses animais, tem permitido a obtenção de ganhos consideráveis na rapidez e condições de desenvolvimento desses animais.

Ficarão portanto, para modificações genéticas (transgénese) genes particulares, normalmente um, e correspondentes promotores. Isto quererá dizer que por ora estas modificações genéticas podem corresponder por exemplo; aos animais knockout para modelos de variadíssimas situações patológicas; ou

aos animais sem expressão PrP (proteína priónica); ou a ovinos com o gene da fibrose quística; ou aos suínos sem estruturas nas superfícies celulares responsáveis pela rejeição hiperaguda do transplante dos seus tecidos para outras espécies animais; ou ainda à produção de leite, sangue ou ovos dos animais de determinado tipo de proteínas dotadas de valor terapêutico sobretudo para seres humanos.

Portanto, por ora os multigenes implicados como factores indicativos de melhores performances de produção animal, serão talvez alcançados através de simples clonagem sem modificações do DNA ou seja sem transgénese. O que sair fora disto, aspectos qualitativos, poderá recair na manipulação genética do DNA endógeno do animal por alteração deste ou mesmo pela introdução de construções de DNA exógeno.

Por outro lado, a clonagem por N.T., nas espécies animais em que não tem sido possível até hoje, obter e isolar linhas de células estaminais embriónicas, pode ser uma ferramente básica para operações de transgénese de diversa índole.

Mesmo que se venha a considerar que a simples clonagem terá pouco interesse nas espécies pecuárias com finalidades produtivas, algumas clonagens terapêuticas já imprimem novas nuances a toda esta problemática, sobretudo quando aplicadas aos animais de companhia.

Ocorre ainda, que em todas as manipulações genéticas nos animais, que vizem finalidades terapêuticas, produtivas ou de qualquer outra natureza, a clonagem como técnica básica é neste momento e por ora, uma ferramenta indispensável para se poder com precisão, e de forma seleccionável e controlável, oferecer essas manipulações.

Clonagens, construções de material genético, manipulações celulares de células dadoras e/ou receptoras de núcleo, condicionamento de fêmeas de aluguer, ou das condições de manutenção e/ou diferenciação celular, e meios de análise e controlo de todas estas etapas são as pedras basilares da biotecnologia animal.

A clonagem dos animais das espécies pecuárias parecem ser mais eficientes (maior frequência de sucesso) do que nos ratinhos (Capecchi, M.R., 2000). Uma das causas desta situação é a possível diferença no tempo associado com cada uma das primeiras divisões celulares, bem como a rapidez com que os produtos da expressão dos genes do zigoto são necessários para manter o desenvolvimento normal das diversas espécies.

Tudo isto pode ser a causa de ocorrerem diversos tempos para que um núcleo somático entrando no citoplasma do oócito, mude a sua programação de núcleo somático para uma programação de núcleo embriónico.

Embora a clonagem dos animais não pareça aumentar o valor comercial das espécies pecuárias, ela poderá como técnica de base permitir nestes animais, a produção de produtos terapêuticos, por transgenese, tal como xenotransplantações para seres humanos e até a salvaguarda de espécies porventura em vias de extinção.

Contudo não pode esquecer-se que o meio envolvente dos animais clonados contribui para a sua individualidade e um descendente clonado poderá ser muito diferente do seu progenitor.

Bibliografia

- Alessi, Fet ali, (1998). The cyclin-dependent kinase inhibitors olamoucine and roscovitine arrest human fibroblastos in G1 Phase by specific inhibition of CD K2 Kinase activity. Exp. Cell Res, 245:8-18.

- Arat, S.er alli (2005). Cloned embryos can be produced using donor cells obtained from a 72 hour cooled carcass. Reproduction, fertility and development vol. 17, nº 182 . Proceedings of annual conference of International Embryo Transfer society, Copenhagen, Denmark, 8-12 January 2005. p. 28.

- Baguisi A, Behboodi E,Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammusu C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios My Ayres Sl, Demiston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godrie RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. 1999 Production of Goats by Somatic cell nuclear transfer. Nat Biotechnol; 17: 456-C.

- Barnes, FL. et alii (1993). Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA syntesis, nuclear envelope breakdown, Chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos, Mol. Reprot Dev. 36:33-41.

- Betthauser J.,Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsylthe T, Golucke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Maltion VT, Mess G, Misica P, Pace M, P fister – Genskown, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M.2000 Production of cloned pigs from in vitro-systems. Nat Biotechnol ; 18: 1055-1059.

- Bren, 6, e Kunholzer, B. (2002). The Recent History of Somatic cloning in mammals. Cloning stem cells, 4: 57-63.

- Campbell, Kus et alii (1996). Cell Cyale co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev.Reprod, 1: 40- 45.

- Campbell KH, Mawhir J, Ritchie WA,Willnut I. 1996 Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature; 380: 64 – 66.

- Capecchi, M.R. (2000). How close are we to implementing gene targeting in animals other, than the mouse? PNAS, 97;3:956 – 957.

- Chavatte – Palmer, P, et alii (2002). Clinical, Hormonal, and Hematologic Characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. Biol. Reprod. 66, 1596 – 1603.

- Chesne P, Heyman Y, Peynot N, Renard JP. Nuclear transfer in cattle: Birth of cloned calves and estimation of blastomere totipotency in morulae used as a Source of nuclei 1993 [Published erratum appears in C R. Acad Sci III ; 316:641]. CR Acad Sci III 1993; 316:487 – 491.

- Cibells J.B., Stice SL, Golucke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. 1998 Cloned Transgenic Calves Produced fom non quiescent fetal fibroblasts. Science; 280: 1256 – 1258.

- Cindy Tion, X. et alii – (2005). Meat and milk compositions of bovine clones. PNAS, 102, N12,6251-6260.

- Daniels, R, Hall, V. e Trouson, A.V. (2000). Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. Biol.Reprod. 63: 1034-1040.

- Delhaise F,ectors FJ, de Roover R, Ectors F, Dessy F. 1995 Nuclear transplantation using bovine primordial germ cells from male fetuses. Reprod fertil Dev; 7: 1217-1219.

- Dominkc, T. et. alii (1999). Bovine Oocytes cytoplasm Supports Development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mamaliam species. Biol. Reprod 60: 1496.

- Du, ZT et alii (1998). Development of nuclear transfer embryos using porcine fetus fibroblasts (abstract). Theriogenology 51:21.

- Duby, R.T. et alii (1996). Prepubertas Calves as Oocyte denors: Promises and problem. Theriogenology, 45: 121-130.

- First NL, Sims MM, Park SP, Kent – First MJ. 1994 Systems for production of Calves from cultured bovine embryonic cells. Reprod Fertil dev; 6:553-562.

- Forsberg, E.J. et alii (2002). Production of cloned cattle from in vitro systems. Biol. Reprod 67, 327-333.

- Galli, C. et alii (2003). A Cloned horse born to its dam twin. Nature 424,635.

- Gandolfi, F: et alii (1998). Comparative analysis of calf and cow Oocytes during in vitro maturation Mol Reprod. Dev.49:168-175

- Gibbons, et alii (2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from rocovitine-treated adult somatic cells. Biol. Reprod, 66:895-900.

- Goto, K. et alii (1997). Production of a nuclear-transfered calf, by the intracytoplasmic injection of donor cells. J. Reprod Dev 43:257-260.

- Heyman, K. et alii (2003). Frequency and occurence of late-gestation losses from cattle cloned enbryos. Biol. Reprod 66, 6-13.

- http://www.ansci-cornell.edu/courses/as150/labs/lab3.html

- Hwang, W.S., et alii (2005). Patient-specifie embryonic stem cells derived from human SCNT-blastocystes. Science, 308. (20 May 2005).

- IETS. A Procedural guide and general information for the use of the enbryo transfer technology emphasizing Sanitary Procedures. 1998 In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds.),Manual of the International embryo transfer society, 3rd ed. Savoy, IL: International Enbryo Transfer Society;:167-170.

- Josefsberg, L.B. et al. (2000). The Proteosome is envolved in the first metaphase- to- anafase transition of meiosis in rat Oocytes. Biol. Reprod. 62, 1270.

- Kafr, Ti et alii (1992). Developmental pattent of gene-specific DNA Methylation in the mouse embryo and germ line. Gene Dev. 6, 705-714.

- Kato Y, Tsunoda Y. 1993 Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. Mol Reprod Dev.; 36:276-278.

- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawak, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y.1998 Eight Calves Cloned from somatic cells of a single adult Science; 282:2095-2098.

- Kato, Y, Tani T, Tsonudu Y. (2000). cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult new born and fetal cows. J. Reprod. Fertil 120: 231-237.

- Keefer, CL. et alii (1999) Pregnancie following transfer c/ reconstructed embryos derived from bell (r) fetal fibroblast and in vitro – matured- Oocytes (abstract). Biol. Reprod 60: 553.

- Khatir, H et alii (1998). Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of Oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation.
  The- rigenology, 55: 1107-1116.

- Kline, D e Kline M.F. (1992). Repetitive Calcium transients and the role of calcium in the mouse egg. Dev. Biol. 149, 80-89.

- Kubota, C. et alii (2000). Six cloned. Calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. Proc-Natt-Acad-Sin USA, 97, 990-995.

- Kubota, C. ert alii (2004). Serial Bull cloning by somatic cell nuclear transfer. Nature Biotech. 22, 693-694.

- Kupholzer, B et Prathrer, R.S. (2000). Advances in livestock nuclear transfer. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 224: 240-245.

- Lavoir MC, Basrur PK, Betteridge K J. 1994 Isolation and Identification of germ cells from fetal bovine ovaries. Mol Reprod. Dev.; 37: 413-424.

- Lavoir MC, Rumph N, Moens A. King WA, Plante Y, Johnson W H, J, Betteridge KJ. 1997 Development of bovine nuclear transfer embryo made with Oogonia. Biol. Reprod; 56:194-199.

- Lee, B.C., Woo Suk Hwang (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. Nature 436,641.

- Levesque, J e Girard, MA (1994). Proteins in Oocytes from Calves and adult cow before maturations relationship with their development capacity. Reprod. Nutr Dev, 34: 133-139.

- Mace, M.M. Et ali. (2002) – Ontogeny of cloned cattle to lactation. Biol. Reprod. 67, 334-339.

- Martin, M. et alli (2004). Pre-weaning performance and health of pigs born to cloned (fetal cell derived) swine versus non cloned swine.
  The- riogenology 62 (1-2): it3 -22.

- Matsui Y, Zsebok, Hogan BL. 1992 Derivation of puripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cell in culture. Cell; 70: 841-847.

- Mc creath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnicke AE, Kind AJ. 2000 Production of gene- targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature; 405: 1066-1069.

- Miyashita, N. et ali. (2002). Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. Biol.Reprod. 66, 1649-1655.

- Miyoshi, K. , et ali. (2003). Improvements im cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocyts and donor cells. Biol. Reprod. 68, 1079-1086.

- Moor, RM. Et ali. (1998). Oocyte maturation and embryonic failure. Hum Reprod update, 4:223-236.

- Mullins, L.J. Wilmut, I,S Mullins, J.J. (2003). Nuclear transfer in rodents. The Journal of Physiology 554: 4-12.

- Nagy, A. et ali. (1993). Derivation of completely cell cultured derived mice from early- passage embryonic stems cells. Proc. Nate. Acad. Si USA 90, 8424-8428.

- Niemann, H. et ali. (2002). Gene expression patterns in bovine in vitro- produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. Cloning Stems Cells 4: 29-38.

- Norman, H.D. et ali. (2004). Performance of Holstein clones in the United States. J. Dairy Sci 87: 729-738.

- Numchaisrika, P. ert ali. (2005). A preliminary study of the in vitro development of Asian elephant, cloned embryos reconstructed using a rabbit recipient oocyte. Reproduction, Fertility and Development vol.17, nº 1 e 2. Proceedings of the animal conference of the International Embryo Transfer Society Copenhagen, Denmark, 8-12 January 2005, p.59.

- Onishi A, Iwamoto M, Akila T., Mikawa S, Takeda K.i Awata, Hanadahl, Perry Ac. 2000 Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science; 289: 1188-1190.

- Pace M, Augenstein M,Betthause J, Childs L, Eilertsen Enos J, Forsberg E, Golueke P, Graber D, Kemper J. Koppang R, Lange G, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Bishop MD. 2002 Ontogeny of cloned cattle to lactation. Biol. Reprod; 67: 334-339.

- Pain, B, Chenevier, p. et Saramut,) (1999). Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies. Cells Tissues Organs 165, 219.

- Paterson, L. (2002) – Somatic cell nuclear transfer (clone efficiency. Http://www.roslin.ac.uk/public/webtables GR.pdf-

- Peura TT, Lane MW, Lewis IM, Trounson A O. 2001 Development of bovine embryo-derived clones after increasing Rounds of nuclear recycling. Mol Reprod Dev ; 58: 384-389.

- Piedrahita, J.A., Moorekk, Oetama B, Leeck, Scales N, Ramsoondar J. Razer F.W., OTT T.1998 Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. Biol. Reprod 58: 1321.

- Piedrahita JA, 2000 Targeted modification of the domestic animal genome. Theriogenology 53: 105-116.

- Polejaeva IA, Chen S-H, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Walker S, Ayares Dl, Colman A, Campbell KH.2000 Cloned Pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature 407: 505-509.

- Prather, RS et ali. (1989). Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenese Biol. Reprod.41:123-132.

- Prelle, K, Vassilev, I.M. et ali. (1999). Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species present status and future prospects. Cell Tissues Organs 165, 220-235.

- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ.1992 Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. Nature; 359: 550-551.

- Sansinema, M. et ali. (2005). Ooplasmic transfer after terspecies nuclear transfer : presence of foreign mitochondria pattern of migration, in effect on embryo development. Reproduction, Fertility and Development vol.17 nºs 1&2. Predings of the Annual Conference of the International Embryo transfer Society, Copenhagen, Denmark, 8 – 12 January (2005).p.64.

- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S., Bugg EM, Little field JW, Donovan PJ; Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD.1998 Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [Published erratum appears in Proc. Natl Acad Sei USA 1999; 96: 11-62]. Poc. Natl Acad Sei USA ; 95: 13726-13731.

- Stice, SL, Keeper CL. Multiple generational bovine embryo cloning. Biol. Reprod. 1993; 48: 715-719.

- Stice, SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L.1996 Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer Biol. Reprod ; 54:100-110.

- Strelchenko N, Betthauser J, Jurgella G, Forsberg E, Damiani P, Golueke: P, Pace MM, Bishop MD.1998 Use of somatic cells in cloning. In: Genetically Engineering and Cloning Animals Symposium; Utah State University, Logan, UT.

- Su, L. et ali. (2005). In vitro development of Yak (Poephagus mutus) cloned embryos by interspecies somatic nuclear transfer. Reproduction, Fertility and Development vol.17 nº 1 e 2. Proceedings of Animal Conference of the International Embryo for Society, Copenhagen, Denmark, 8-12 January, 2005p. 66.

- Surani MA.1999 Reprogramming a somatic nucleus by trans-modification activity in germ cells. Semin Cell Dev. Biol.; 10:273-277.

- Tao, T, Boquest AC et ali. (1999). Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fibroblasts cells. Cloning 1; 55-62.

- Tao, T. et ali. (1999). Development of pig embryos by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into in vitro matured oocytes. Anim. Reprod Sei. 56: 133-141.

- Tecirlioglu, B.T. et ali. (2005). Reproductive Performance of cloned bulls. Reproduction, Fertility and development, vol.17, nº 1 e 2. Proceedings of the Annual conference. of the International Embryo Transfer Society. Copenhagen, Denmark, 8 – 12 January 2005.p.68

- Thompson, J.G. (1997). Comparison between in vitro derived and in vitro-produced pre-e longation embryos from domestic ruminants. Reproduction, Fertility and development 9, 341-354 .

- Tsunoda Y, Kato Y.1993 Nuclear transplantation of embryonic stem cells im mice. J. Reprod. Fertil; 98: 537-540.

- Van Vleck, L.D.(1999)- Implications of cloning for breed improvement strategies: are traditional methods of animal improvement obsolete? J. Anim. Sci, 77, Suph 2: 111-21.

- Wakayama, T. et ali. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 394: 369-374.

- Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P.1999 Mice cloned from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sei USA; 96: 14984-14989.

- Wang, WH, et ali. (1997). effects of oocytes maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. J. Reprod. Fertil.111: 101-108.

- Warriach, H, et Chohan, K.R. (2004). Thickness cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. J.Vet Sci. 5 (3): 247-251.

- Wells, DN, Misica PM, Day TA, Fervit HR. 1997 Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo and in vitro-matured cytoplasts. Biol. Reprod.; 57: 385-393.

- Wells DN, Misica PM, Tervit HR 1999 . Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol. Reprod.; 60: 996-1005.

- Westhusin, M.E. (2003). Mammalian cloning.
Http://www.begc.crbr.ulalal.ca/themes/themes 6.htm.

- Wheeler MB. 1994 Development and validation of swine embryonic stem cells: a review.Reprod Fertil Dev.; 6: 563-568.

- Wilmut, I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KH.1997 Viable offsprins derived from fetal and adult mammalian cells [published appears in Nature; 386:200]. Nature; 385:810.

-Woods, G.L. et ali. (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. Nature 301, 1063.

- Wrenzycki, C. (2003). Effects of culture conditions on gene expression patterns in bovine preimplantation embryos. Http://www.begc.crbr.ulaval.ca/themes/themes8.htm.

- Yang, F, et ali. (2005)- Rabbit nuclear transfer with cultured somatic cells. Reproduction, Fertility and Development, vol.117, nºs 1 e 2. Proceedings of Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Copenhagen, Denmark, 8-12 January 2005, p.75.

- Yin, X.J., et ali. (2005). Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer Reproduction 129, 245-249.

- Young, LE, et ali. (1998). Large offspring Syndrome in cattle and sheep. Review of Reproduction 3,155-163.

- Zakhartchenko, V et ali. (1999). Effects of serum starvation re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. J. Reprodut. Fertil 115, 325-331.

- Zakhartchenko, V. et ali. (1999). Adult cloning in cattle.Potential of nuclei from a permanent cell line and from primary culture Mol. Reprod. Dev. 54:264-272.

- Zernicka – Goetz, M (1991). Spontaneous and induced activation of rat oocytes. Mol. Reprod.Dev. 28,169.

- Zhou, Qi et ali. (2003). Generation of fertile clones rats by regulation oocyte activation, Nature 302, 1179.

TRANSGÉNESE NOS ANIMAIS

ÍNDICE

1 – Introdução 106

2 – Algumas características básicas para o gene targeting, em espécies pecuárias 108
2.1 – Características das células para transgenese 109
2.2 – Vida útil de populações celulares somáticas 110
2.3 – Algumas outras características susceptíveis de manipulação pelo gene targeting dos animais. 111
2.4 – Características da construção dos transgenes (tg) 112

3 – Comparação entre a transgénese por transfecção com retrovírus, microinjecção pronuclear num zigoto e transferência do transgene para células ES ou outro tipo de células pluripotentes. 113

4 – Dificuldades, eficiências e tentativas de melhoria na transgénese. 114

5 – Alguns aspectos peculiares da transgénese nos animais. 120

6 – Identificação de animais transgénicos e exame da estabilidade dos transgenes. 125
6.1 – Para identificação do transgene (tg) 128
6.2 – Para análise da expressão ao nível da transcrição 129
6.3 – Para análise da expressão ao nível da tradução 129

7 – Estabilidade da expressão dos transgenes. 129

8 – Silenciamento de genes como um meio que ameaça a geneterapia. 130

9 – Mosaicismo. 131

10 – Descrição sucinta de algumas transgéneses em diversas espécies animais. 132
10.1 – Transgéneses em bovinos 133
10. 1.1 Transgéneses em série em bovinos da imunoglobulina _ e da proteína priónica. 133
10.1.1.1 – Células a utilizar. N/a
10.1.1.2 – Algumas características da construção do transgéne. N/a
10.1.1.3 – Construção dos transgenes e vectores. 136
10 .1.1.4 – Cromatina remodelada “in vitro” para clonagem de vitelos. 138
10.1.2 – Bovinos resistentes à BSE 138
10.1.3 – Outros bovinos transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções. 139
10.2 – Transgéneses em suínos 139
10.2.1 – Alguns exemplos de transgénese em suínos 140
10.2.1.1 - Transgénese de _ – lactalbumina bovina em suínos 140
10.2.1.2 – Produção de suínos deficientes em xenoantigénios 141
10.2.1.2.1 – Clonagem transgénica em suínos para promover o knockout de um dos alelos do gene da _ 1,3 – galactosilotransferase (_ 1,3 GT) 141
10.2.1.2.1.1 – Células dadoras de núcleos 141

10.2.1.2.1.2 – Construção do transgene 142
10.2.1.2.1.3 – Oócitos como células receptoras de núcleos 143
10.2.1.2.2 – Clonagem transgénica em suínos para knockout do 2º alelo do gene _ 1,3 GT 143
10.2.2 – Outros suínos transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções. 144
10.3 – Transgéneses em ovinos e caprinos 145
10.3.1 – _ -1- antitripsina humana (hAAT) 145
10.3.2 – PrP e GGTA 1 145
10.3.3 – Factor IX da coagulação sanguínea humana 145
10.3.4 – Ovinos e caprinos transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções 145
10.4 – Transgénese em Ratinhos 146
10.4.1 - Murinos e galinhas transgénicas produzidas com o objectivo de melhorar as suas produções 147
10.5 – Peixes transgénicos 147
10.5.1 – Peixes transgénicos para produtos biofarmacêuticos 149
10.6– Transgénese aviária 149

11 – Produtos farmacêuticos produzidos por clonagem e alguns exemplos de animais transgénicos que exprimem produtos farmacêuticos ou biomateriais utilizados em humanos e para outros fins 153

12 – Número de animais transgénicos na Austrália e Nova Zelândia N/a

13 – Bibliografia 157

1- INTRODUÇÃO

Em 1981, Gordon, J.W e Ruddle, F.H. criaram a expressão " Transgénico"para expressar animal (no caso ratinho) geneticamente modificado pela transmissão de um DNA estranho para um embrião em início de formação.

Hoje esta expressão aplica-se a um animal que tenha um genoma modificado pela integração estável de uma sequência genética recombinada "in vitro" (Rulicke, T.et Hubscher, U 2000), ou seja moléculas de DNA construídas "no tubo de ensaio" unindo fragmentos de DNA que normalmente não são contíguos (transgene ou tg).

Por transgénese e gene "targeting"(alvejar um determinado gene), podem entender-se fenómenos com a mesma base mas com "nuances" diferentes. Com efeito, a transgénese pode consistir em introduzir um gene exógeno (dador) não existente num genoma receptor, enquanto gene " targeting", mais precisamente, pode consistir na introdução de um gene exógeno correspondente a um dado gene endógeno existente no genoma receptor, mas esse gene exógeno está manipulado em ordem a conter informação que induza o silenciamento, a correcção ou a super-expressão do gene cognato do genoma receptor. Dito de outra forma gene "targeting" é uma metodologia específica dentro da transgenese.

Da mesma forma houve que considerar diferentes nuances entre clonagem terapêutica e geneterapia. No caso da clonagem terapêutica pode-se simplesmente recorrer à obtenção de clones de células funcionais que substituam uma dada população de células análogas lesadas. É o caso por exemplo da obtenção a partir de células indiferenciadas da medula óssea, ou de outros tecidos, de clones celulares susceptíveis de substituírem células lesadas nas massas musculares, inclusive cardíacas, vasos, fígado, rim, sangue, etc. Na geneterapia tem que se descer a um outro nível, na medida em que se tem que intervir na estrutura de um dado gene, manipulando-a consoante interesse, e depois na maior parte dos casos introduzir essa modificação num vector adequado que possa ser direccionado eficazmente para células , tecidos ou órgãos alvo.

Através do gene "targeting" é possível substituir sequências de DNA endógeno numa determinada localização , por um DNA exógeno construído(James,J. et Robbins, J, 1997). Para isto torna-se necessário uma recombinação homóloga do DNA exógeno, por exemplo electroporado para células receptivas adequadas, como pode ser o caso de células estaminais embriónicas totipotentes (ES), ou outro tipo de células pluripotentes.

Habitualmente a construção do DNA exógeno contém marcador ou marcadores escolhidos que permitem nos processos de selecção que se seguem identificar as poucas células em que ocorreu a recombinação homóloga, na população celular em causa.

A construção de DNA exógeno consiste habitualmente de extensas regiões de homologia com aquelas que flanqueiam o local a alvejar no DNA endógeno, e contêm normalmente pelo menos um ou dois marcadores escolhidos. Depois torna-se necessário que as sequências endógenas correspondentes, sejam rompidas, com os elementos de DNA críticos para a transmissão e/ou tradução do gene endógeno a serem substituídos ou por uma sequência que contém inclusive um marcador escolhido ou por uma sequência não codificadora inócua. Pode assim gerar-se por exemplo um alelo inactivo ou seja um locus do gene que não é transcrito não se produzindo portanto o polipéptido funcional correspondente.

Referem-se, genericamente, no quadro seguinte alguns dos métodos ensaiados para obtenção de animais transgénicos(Wheeler, M.B.,2003)

1 – Transferência por retrovírus do DNA construído
2 – Microinjecção do transgene construído no pronúcleo de ovos fertilizados
3 – Injecção em cavidades de blastocitos, de células estaminais embriónicas(ES), células germinativas embriónicas(EG) ou outro tipo de células adequadas previamente expostas ao trangene
4 – Transgene veiculado pelo esperma durante a fertilização "in vitro"
5 – Transferência do DNA para células e embriões, mediada por lipossomas
6 – Electroporação do transgene para esperma, óvulos, embriões ou outras células adequadas
7 – Biolística ou seja a injecção em determinado tipo de células, do transgene misturado com pequenas partículas metálicas
8 – Transferência para oócitos enucleados, de núcleo(N.T.) contendo o transgene, doado a partir de células embriónicas ou somáticas adequadas

As vantagens permitidas por este último método em relação aos métodos de microinjecção no pronúcleo, ou à transferência por retrovírus, são ineludíveis, como veremos adiante.

Antes do advento da N.T. a transgenese era na maior parte das vezes feita por injecção do DNA exógeno no pronúcleo de um ovo fertilizado, sendo portanto a inserção desse DNA exógeno no genoma endógeno, ao acaso (ao contrário do que sucede no gene "targeting"), sendo diversas cópias desse DNA exógeno colocadas no genoma endógeno, habitualmente num ponto e num arranjo, molécula a molécula de cabeça com cauda ou de cabeça com cabeça (James, J.e Robins,1997). Esta colocação ou ponto de inserção não pode neste caso ser controlada, tal como não pode ser controlado o número de cópias a inserir.

Assim, neste processo ao acaso, é impossível prever ao contrário do gene "targeting", os locais dessa inserção.

Naquelas circunstâncias a expressão do transgene será superimposta áquela dos genes endógenos. Por outro lado a colocação ao acaso deste DNA exógeno no genoma endógeno pode ter efeitos mutagénicos (roturas, rearranjos, delecção do DNA flanqueador) embora estes efeitos tendam a ser recessivos(James/ e Robins, J.J.1997).

Comparação da trangénese com o gene "targeting"

	Gene "targeting"	Transgenese por injecção pronuclear do transgene
Locus de inserção	Altamente específica e em local conhecido	Ao acaso e em local desconhecido
Número de cópias inseridas	Uma cópia	Várias cópias concatameros
Consequências		Mutagenese de inserção? Efeitos de posição? Expressão dependente do número de cópias?

Os efeitos da injecção pro-nuclear do transgene serão pois inserções de multiplas cópias do transgene em locais ao acaso do genoma, sendo a maioria dos genes integrados susceptíveis aos efeitos de silenciamento cromossomal que reprimem a expressão. A natureza repetitiva do locus transgene e as sequências cromossomais no local da inserção ou próximas deste, contribuem para os efeitos anteriores.

Se a introdução do transgene convenientemente construído for feito por clonagem N.T. pode obter-se a inserção precisa de uma única cópia em local definido o que permite ultrapassar alguns dos efeitos desencadeados pela injecção pro-nuclear do transgene.

Transgenese e gene "targeting" são por vezes utilizados com finalidades diferentes como já deixámos implícito, sendo a transgénese utilizada para ganhar novas funções enquanto o gene targeting é utilizado para aumentar ou suprimir funções existentes.

Assim por gene "targeting" pode alvejar-se a redução de produtos indesejáveis ou o inverso (como por exemplo certo tipo de conteúdo lipídico na carne) e na transgénese a produção de produtos desejáveis (como por exemplo produtos farmacêuticos no leite, sangue ou ovos) (Capecchi, M.R.,1989).

Através do gene "targeting" pode escolher-se o gene a ser modificado e o tipo de modificação a introduzir.

O gene "targeting" é pois utilizado para modificar o genoma hospedeiro.

Nos animais são conhecidas inúmeras doenças genéticas e á medida que os genes responsáveis por essas doenças forem identificados e clonados será possível a concepção e ensaio de novos protocolos terapêuticos inclusive a geneterapia, ferramentas estas um tanto diferentes dos simples transplantes celulares de variadíssimos tipos de células estaminais, ou outras compatíveis e utilizáveis em diversíssimas situações patológicas inclusive de caracter não genético.

São pois perspectivas terapêuticas novas que permitirão novos horizontes de intervenção clínica com cariz cada vez mais centrado no paciente individual e que passarão até pelo rastreio da eficácia ou adequação de um dado fármaco para patologias concretas.

2 – ALGUMAS CARACTERÍSTICAS PARA O GENE "TARGETING" EM ESPÉCIES PECUÁRIAS. (CLARK,J;2000)

Até à relativamente pouco tempo a única forma para conseguir animais de espécies pecuárias modificados geneticamente consistia na injecção directa de novas sequências de DNA no pronúcleo de um óvulo fertilizado(injecção pro-nuclear)descrita por Hammer, R.E.et alii,1985.

Como referimos com esta metodologia não era possível controlar o local em que se integrava o transgene no DNA nem o número de cópias integradas no DNA (consequentemente com níveis de expressão imprevisíveis) nem tornando possível a modificação dos gene endógenos do próprio animal.

No ratinho e com a utilização de linhas de células estaminais embriónicas(ES) foi possível ir mais além inclusive a modificação de genes endógenos do próprio ratinho, e se introduzidas essas células num embrião em início de formação podia-se conseguir a formação de linhas germinativas contendo a modificação introduzida.

Estas linhas de células estaminais embriónicas do ratinho quando transfectadas com DNA exógeno possuem ainda capacidade para recombinação homóloga o que permite a introdução de modificações genéticas com precisão.

Hoje os ratinhos são modificados geneticamente com facilidade, quer através de delecções,substituição ou modificação de genes escolhidos.

Infelizmente estas linhas de células estaminais embriónicas não têm sido isoladas por ora a partir das espécies pecuárias .

Contudo como já referimos, a tecnologia da clonagem por transferência de núcleos (N.T.) derivados de células em cultura (Campbell,K.H.S.et alii, 1996;Wilmut,I et alii.1997) veio permitir nas especies pecuárias, uma alternativa, para alcançar as modificações genéticas desejadas.

2.1 – Características das células para transgenese por N.T.

A N.T. e as modificações genéticas que podem ser introduzidas no núcleo antes da clonagem, com precisão, tornam possível transmitir estas modificações para as linhas germinativas dos animais das especies pecuárias.

É necessário no entanto desenvolver células que mantenham a sua totipotência ou pluripotência para N.T. após modificações genéticas várias imprimidas.

Como Já referimos anteriormente a clonagem por N.T. tem sido conseguida em ovinos, bovinos, caprinos e suínos(Polejaeva, J.A. et alii,2000) e mais recentemente noutras espécies de animais.

Nos bovinos estão assinaladas eficiências destas N.T. da ordem dos 10%(sobreviventes em relação aos blastocistos transferidos) embora se assinale elevada mortalidade peri-natal e consequências nefastas a longo termo.

Como células dadoras de núcleo para N.T: diferentes tipos somáticos estão referenciados, inclusive fibroblastos adultos e fetais, células do ovário, musculares e do epitélio mamário, todas elas derivadas de tecidos adultos ou fetais, e depois cultivadas em laboratório(culturas primárias).

As células somáticas podem ser modificadas geneticamente antes da N.T. permitindo transmitir essas modificações ás linhas germinativas. Para isso as células podem ser, transfectadas, por exemplo com as construções exógenas de DNA, seleccionadas depois e testadas para saber da modificação genética operada antes da N.T. sendo as células modificadas geneticamente seleccionadas antes da N.T., sendo nessas circunstâncias todos os animais nascidos, transgénicos.

As células utilizadas na maioria das experiências de N.T. em espécies pecuárias são células somáticas primárias que diferem entre si quanto á sua resposta quando são seleccionadas, bem como quanto à frequência da modificação genética e condições de crescimento.

Normalmente a modificação genética baseia-se na recombinação entre a construção de DNA transfectado e as sequências homólogas no genoma das células (Capecchi,M.R.,1989) o que implica o emparelhamento destas sequências, seguido pela quebra do DNA e troca entre o vector da modificação e as sequências cromossomais endógenas. O vector normalmente contém duas regiões complementares das sequências cromossomais, e entre estas duas regiões, uma região não homóloga que muitas vezes contém

um marcador seleccionado, como por exemplo resistência a um dado antibiótico ou um fluorocromo. A recombinação de cada lado do ,marcador origina a inserção precisa no cromossoma e ao mesmo tempo delecta parte ou todo o gene em alvo.

Esta modificação genética precisa operada é muito rara ocorrer na população celular em causa (talvez uma em cada 10 células) sendo necessário dispôr de métodos para identificar e seleccionar as células que correctamente receberam a modificação genética (daí a importância de ter introduzido nessa modificação genética um marcador adequado).

Um tipo de células muito utilizado na clonagem por N.T. como referimos são os fibroblastos fetais ovinos e bovinos que proliferam rapidamente "in vitro"e podem ser eficientemente transfectados por electroporação ou por lipofecção. Mas mesmo assim este tipo de células somáticas em relação ás células estaminais embriónicas é muito menos eficiente para receber modificações genéticas tornando necessário o seu enriquecimento em cultura para se poder detectar e seleccionar as modificações genéticas introduzidas.

Vários tipos de vectores podem ser utilizados para alcançar as modificações genéticas pretendidas, mas a estratégia metodológica que não recorre a promotores é reputada como originando maior enriquecimento das modificações genéticas, o que necessita no entanto que o gene alvo seja expresso. Se o gene alvo não é expresso no tipo de células utilizado tudo se complica, sendo necessário escolher um tipo de célula dadora de núcleo que exprima o gene a modificar geneticamente.

As células modificadas geneticamente e destinadas a N.T.(provenientes de uma única célula seleccionada) são expandidas em ordem a fornecer células para N.T. e suficiente DNA para se confirmar se a modificação genética pretendida foi ou não conseguida. Mas como a eficiência alcançada, desta modificação genética é relativamente baixa é preciso rastrear um grande número de clones candidatos. Uma vez isoladas potenciais células candidatas, são necessárias análises do DNA (por exemplo por PCR ou Southern blotting, vide adiante) para identificar o locus modificado geneticamente e discriminar os alelos modificados geneticamente dos não modificados geneticamente.

Nas células somáticas, recorda-se, há pelo menos duas cópias de cada gene autossomal, das quais apenas uma é modificada geneticamente(veremos adiante casos em que foi possível modificar geneticamente dois alelos).

2.2 – Vida útil das populações celulares somáticas

As células somáticas dos animais das espécies pecuárias relativamente ás células estaminais embriónicas dos ratinhos têm uma esperança de vida limitada. Com efeito as células estaminais embriónicas do ratinho são células pluripotentes que se podem dividir muitas vezes em cultura sem perder a sua capacidade para gerar linhas germinativas, podendo as alterações genéticas nelas introduzidas, e depois essas mesmas células serem seleccionadas e multiplicadas sem entrarem em senescência.

No caso dos fibroblastos fetais ovinos em culturas primárias estas células podem dividir-se 80-100 vezes antes de pararem de se multiplicar, e senescer. Contudo esta é a longevidade das melhores células pois sucede que a maioria das culturas primárias de células são heterógeneas e uma grande quantidade dessa população de células tem uma vida média bastante mais curta. Calcula-se (Clark,J. 2000) que são necessárias cerca de 45 duplicações das populações celulares para se conseguir produzir células

modificadas geneticamente para N.T., isto utilizando células somáticas derivadas de fetos e utilizando uma metodologia envolvendo a electroporação, selecção e rastreio.

Trabalhando com esta vida média natural destas populações celulares (relativamente limitada) é difícil, com as tecnologias por ora disponíveis, introduzir uma ou mais modificações genéticas nos respectivos genomas.

Há no entanto meios para aumentar esta vida média das células cultivadas, como por exemplo a transfecção das células com genes codificando telomerases.

É no entanto necessário que a inserção destas telomerases não comprometa a totipotência ou pluripotência das células em cultura.

Nos ovinos os telómeros degradam-se a um ritmo de cerca de 0,59 Kb por ano, "in vivo", mas nas culturas "in vitro" esta degradação é muito mais rápida (Shiels,PG et alii,1999).

2.3 – Algumas outras características susceptiveis de manipulação pelo gene "targeting" dos animais (Clark. J., 2000)

As modificações nas linhas germinativas introduzidas pela modificação genética e ao contrário do que sucede na injecção pró-nuclear, são habitualmente recessivas (por exemplo o knockout) ou co-dominantes (por exemplo modificações de genes). É assim necessário modificar ambos os alelos para verificar efeitos fenotípicos. Isto pode ser alcançado na reprodução convencional, mas nas espécies pecuárias leva vários anos até ser alcançado, por exemplo duas gerações para obter homozigotos a partir de animais heterozigotos. Isto nos bovinos pode levar 3-4 anos, podendo ser eliminada uma geração se a modificação genética for introduzida nas células macho e fêmea e os animais clonados, cruzados.

Nas xenotransplantações de órgãos animais, tecidos ou células, a rejeição aguda é um obstáculo poderosíssimo.

A tecnologia do knockout de genes implicados nas epitopes responsáveis por essa rejeição abre novas perspectivas a toda esta problemática.

Esta tecnologia do knockout de genes também poderá ser aplicada na obtenção de resistência a certas doenças como por exemplo as prionoses. Têm sido construídos ratinhos e até bovinos e ovinos com estas características.

Também têm sido construídos ratinhos e outros animais knockout em diversos genes, utilizáveis como modelos para o estudo de diversas doenças humanas e animais(ratinhos e ovinos para estudo da fibrose quística por exemplo).

A velocidade de crescimento dos animais, a melhoria dos seus índices de conversão dos alimentos, a qualidade da carne, leite, lãs e ovos por ex: são objectivos a ter em conta nas explorações das espécies pecuárias e as modificações genéticas que vão nesse sentido são desejáveis. Há diversos exemplos neste contexto como sucede com os fenótipos da garupa dupla em certas raças de bovinos devido a mutações naturais ocorridas no gene da miostatina. O knockout deste gene em bovinos , ovinos e suínos poderá aumentar a quantidade de carne produzida por esses animais(Pirottin,D.,et alii,2005).

Na maioria dos casos os genes knockout apenas revelam o seu efeito quando são homozigotos, pois tendem a ser mutações recessivas. No entanto a utilização do "inbreeding" para este efeito pode levar à depressão consequente desse "inbreeding".

Além da completa supressão da função de um gene submetido a knockout, podem induzir-se modificações genéticas de outro tipo como por exemplo a substituição de genes dos animais por genes com funções idênticas mas humanos, a fim de produzir proteinas de interesse terapêutico para os seres humanos ou mesmo para efeitos de diagnóstico (vide adiante).

2.4 – Características da construção dos transgenes (Tg)

A taxa e perfil de expressão de um transgene, são muito influenciadas pela construção do transgene.

No desenho para a construção de um transgene com alta taxa de expressão em células animais torna-se necessário atender aos seguintes aspectos (Primrose, S.R., et alii, 2001):

- Utilizar promotor constitutivo forte
- Incluir um intrão
- Incluir um sinal para poliadenilatação
- Remover das sequências não traduzidas desnecessárias
- Optimizar o transgene para uma eficiente tradução
- Incorporar um sinal marcador detectável.

Na estratégia para manipular sequências cognatas de DNA endógeno, substituindo-as por DNA exógeno a extensão da homologia entre o vector para a transferência e as sequências de DNA endógeno é muito importante (Capecchi,MB,1989). Capecchi verificou que para homologias entre 2,9Kb e 14,3 Kb, para um aumento de homologias nas sequências de DNA de 5 vezes, originava-se um aumento na frequência de integração do DNA exógeno de 100 vezes (mantendo-se nestas experiências constante a quantidade de estrutura não homologa a ser transferida).

A transfecção e a transformação são vias para introduzir genes no interior das células. No caso das células bacterianas diz-se que são transformadas, no caso das células mamíferas diz-se que são transfectadas porque a transferência de gene é semelhante à infecção por vírus (Bradley, J. et alii, 2001).

Ambos os tipos de células bacterianas e mamíferas podem espontâneamente tomar DNA exógeno, mas com uma eficiência muito baixa e daí numerosas técnicas de transfecção terem surgido para aumentar esta tomada de DNA exógeno, sobretudo a electroporação em que um choque de alta voltagem cria transitoriamente aberturas na membrana celular, através das quais passa o DNA exógeno, e a infecção (transdução) em que os genes são englobados em partículas virais infecciosas.

No entanto como já referimos a transfecção das células mamíferas apenas consegue ter êxito numa pequena fracção de células da população celular total em causa . Este DNA introduzido nas células tipicamente não é replicado e rapidamente se dilui ou se perde do núcleo quando ocorre a divisão celular posterior. Contudo algumas células incorporam o DNA transfectado nos seus cromossomas e podem tornar-se células transfectadas estáveis. Torna-se necessário depois identificar essas células que na realidade tomaram o DNA exógeno o que é feito por rastreio ou selecção das colonias positivas (que englobaram o DNA exógeno) para o que se torna necessário que elas tenham sido marcadas no DNA exógeno (por exemplo: com um gene que confira resistência a um dado antibiótico, como a neomicina, a

puromicina, etc., ou a uma certa toxina, diftérica ou outra) ou que contenham um marcador evidenciável com um substrato cromogénico, ou mesmo um anticorpo monoclonal, etc.

3 – COMPARAÇÃO ENTRE A TRANSGÉNESE POR TRANSFECÇÃO COM RETROVÍRUS, MICROINJECÇÃO PRONÚCLEAR NUM ZIGOTO E TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE PARA CÉLULAS ES OU OUTRO TIPO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES

A infecção com vectores retrovirais (transfecção) e a microinjecção de DNAtg adicionam sequências de DNA exógeno ao genoma dos substratos enquanto a transferência do tg para células ES ou outro tipo de células pluripotentes, em cultura pode permitir alterar um gene endógeno através da recombinação homóloga de um locus cromossomal com a molécula de DNA exógeno transfectado (Rulicke,T et Hübcher, V, 2000).

Os vectores retrovirais têm ainda a limitação de apenas poderem transportar até 8 kb de DNA estranho, além dos riscos inerentes à utilização de vírus.
Perry, A.C. et alii, (2001) verificaram que oócitos de ratinho em metafase II coinjectados com esperma e transgenes, permitem obter construções de vectores muito maiores até 170 kilobases, inclusivé de cromossomas mamíferos artificiais.(Rülicke, T. et Hübscher, V.)

O mais popular meio para gerar mamíferos transgénicos foi até 1996 a microinjecção dos transgénes no interior de pronúcleo de um oócito fertilizado (Rülicke, T. et Hübcher, V.,2000). Hoje está destronada esta metodologia pelas metodologias em que as construções exógenas do DNA são introduzidas em células dadoras de núcleo e estas depois cultivadas e seleccionadas para fusão ou N.T. com oócitos enucleados e esses depois veiculando o transgene para o embrião resultante.

Para a microinjecção o pronúcleo masculino era o preferido pois tinha um tamanho maior e estava melhor posicionado. Por este método da microinjecção, e dependendo do tamanho do transgene, cada zigoto como já referimos recebia desde dezenas até centenas de moléculas de DNA lineares, que antes de se integrarem nos cromossomas, se recombinam em arranjos em tandem concatameros, parecendo haver entre eles um processo de recombinação homóloga entre as diversas cópias (Rülicke,T.et Hübcher,,2000).

A integração do DNA injectado no pronúcleo ocorre em diversas regiões do genoma dos ratinhos parecendo ocorrer ao acaso em locais cromossomais não reprodutíveis, sendo muito infrequentes a recombinação homóloga dos transgenes construídos injectados, com locus endógenos. Por outro lado, o DNA microinjectado pode persistir vários dias, na forma livre.

A recombinação não homóloga do DNA microinjectado pode provocar severas alterações genéticas (delecções, duplicações, translocações, etc.).

Os transgenes integrados estavelmente são normalmente transmitidos à descendência de forma Mendeliana.

A recombinação homóloga entre sequências de DNA residentes no cromossoma de uma célula e a sequência de DNA exógeno clonada introduzida de novo (gene"targeting") permite a transferência de qualquer modificação introduzida neste gene clonado para o genoma de uma célula viva.

As células mamíferas podem efectuar recombinações entre sequências de DNA homólogas, embora tenham maior tendência para realizar recombinações não homólogas (Capecchi, M.,1987) . É necessário pois dispor de meios para identificar as poucas células em que ocorreu esta recombinação homóloga numa vasta população de células em que ocorreu recombinação não homóloga.

Obtido isso essas células em que ocorreu a recombinação homóloga são clonadas e mantidas como uma população pura, podendo depois ser injectadas na cavidade do blastocelio de um embrião pré-implantado ou servirem para N.T. para oócitos enucleados e o blastocisto obtido transferido cirurgicamente para o útero de uma mãe de aluguer onde continuará o seu desenvolvimento até ao seu termo.

O animal obtido será no primeiro caso uma quimera(composta por células injectadas e por células do blastocisto hospedeiro) e a partir destas quimeras por cruzamento dos animais heterozigotos podem obter-se animais homozigotos com a mutação desejada.

4 – DIFICULDADES, EFICIÊNCIAS E TENTATIVAS DE MELHORIA NA TRANSGÉNESE (DENNING,C. ET PRIDDLE H, 2003)

Os variadíssimos sucessos alcançados na transgénese não escondem no entanto as enormes deficiências da produção de animais de espécies pecuárias modificadas geneticamente.

Para esta modificação genética das espécies pecuárias muito se exige das células somáticas primárias pois a eficiência da recombinação homóloga nestas células relativamente àquela assinalada para as células estaminais embriónicas do ratinho é muito baixa (Templeton, N.S. et alii, 1997) . Isto implica a necessidade de utilizar estratégias de modificação genética do tipo marcação de genes sem promotores (Clark, A. J. et alii, 2000- Harrison, S.J.et alii, 2002) o que pode enriquecer estas modificações genéticas 100 a 500 vezes, sendo possível que algumas destas células sejam suficientemente vigorosas para permitir a preparação para a transferência de núcleos (N.T.).

A técnica de modificação genética por gene targeting sem utilizar promotores tem sido o único método utilizado em células somáticas primárias de animais das espécies pecuárias o que se por um lado tem permitido enriquecer as modificações genéticas introduzidas, por outro lado só é utilizável com genes que sejam activamente transcritos nos fibroblastos, que constituem o único tipo de célula validado, com uma longevidade suficiente para permitir a selecção de células com modificações genéticas introduzidas e que possam doar os seus núcleos (Denning, C. et alii, 2001).

Eficiência do gene "targeting" em fibroblastos primários de ovinos e suínos(Denning,C e Priddle, H, 2003)

Gene alvejado "target"	Número de células transfectadas	Colónias resistentes a antibiótico G418 a)	Colónias onde se confirmou o alvejamento do gene b)	Frequência absoluta do alvejamento c)
Ovinos				
COL 1 A1	$5x10^5$	70	46 (66%)	$9x10-^5$
PrP	$5x10^6$	533	5 (1%)	$1x10-^6$
GGTA1	$1x10^7$	1445	25 (1,7%)	$2,5x10-^6$
Suínos				
GGTA1	$4,9x10^7$	159	8 (5%)	$1,6x10-^7$
GGTA 1	$8x10^6$	1105	17 (1,5%)	$2,1x10-^6$

Gene COL1 A1 =_ 1 (I) procolagénio
PrP=proteína priónica
GGTA1= _ (1,3)- galactosil transferase etc

a) Foram isoladas as células que foram estavelmente transfectadas, mas a maioria das colónias resultam da integração ao acaso do vector construído e apenas algumas estão correctamente alvejadas.

b) A percentagem aqui representada entre parêntesis assinala a proporção de colónias com o gene marcado correctamente em relação ao número total de colónias resistentes ao antibiótico G418.

c) Aqui exprime-se o número de células correctamente alvejadas na totalidade da população celular transfectada (frequência do processo de alvejamento).

Salienta-se no quadro anterior que no caso dos ovinos em que se alvejou o gene GGTA1 das 25 colónias de celulas alvejadas correctamente, 23 senesceram antes de se terem expandido suficientemente para poderem ser utilizadas na N.T.

Pode pois suceder que estas células entrem em senescência antes de se expandirem suficientemente para serem utilizadas em N.T. (Denning,C et Priddle, H, 2003), o que tem levado alguns autores (Lai, L. et alii, 2002 in Denning C. et Priddle, H, 2003) para evitar isto, em estudos com células de suínos, a reduzir o tempo de cultura das células utilizando as células dadoras do núcleo modificadas geneticamente logo a seguir à descongelação operada depois da criopreservação.

Há sugestões (Capecchi, M. R., 2000) no sentido de que utilizando transgenes de DNA isogénico e optimizando os processos de culturas das células em ordem a escolher a linha celular

mais apropriada, a maioria das células mamíferas em cultura têm capacidade equivalente (no que se refere à capacidade de ocorrer recombinação homóloga entre as sequências de DNA exógena e endógena) e que a transferência de núcleos de células somáticas cultivadas (e que contenham as mudanças genéticas

desejadas) para oócitos enucleados poderá pois ser uma alternativa à clonagem a partir de células estaminais embriónicas, nos animais das espécies pecuárias.

Nos explantados tissulares em culturas adequadas, o tipo celular que geralmente sobreleva todos os outros é o dos fibroblastos e estes fibroblastos podem ser cultivados "in vitro" com 10-15 passagens, e este número de passagens parece exceder o número de passagens necessárias para obter populações celulares purificadas contendo as modificações genéticas introduzidas (Capecchi, M. R, 2000).

Células germinativas primárias têm sido isoladas de cristas genitais bovinas (bovine genital ridge) e com uma capacidade replicativa que chega ás 85 duplicações (Forsberg, E.J. et alii, 2002), restando saber se elas suportam as operações destinadas a modificá-las geneticamente.

Na modificação genética dos animais das espécies pecuárias um grande problema é pois a limitada capacidade multiplicativa das culturas de células primárias.

Alguns autores (Clark, A. J. et alii, 2000) calculam que para obter células modificadas geneticamente a partir de tecidos fetais e utilizando uma combinação de electroporação, selecção e triagem de células, são necessárias cerca de 45 duplicações das populações celulares para produzir as células modificadas.

Fibroblastos de ovino têm sido cultivados, podendo obter-se cerca de 100 duplicações celulares. Mas as culturas primárias de células são muito heterogéneas, e na realidade só as melhores células podem atingir aquela longevidade (100 duplicações).

De facto a capacidade replicativa das células diminui desde o momento em que são explantadas havendo muitas populações celulares humanas com uma semi-vida de apenas 8 duplicações "in vitro" (Rubin H, 2002).

Nas células dos animais das espécies pecuárias utilizadas nas primeiras passagens como culturas primárias, a maioria das colónias de células não conseguem proliferar suficientemente para permitirem a N.T. e aquelas que o fazem estão muito perto da senescência.

É pois necessário aumentar a vida útil destas células em cultura já havendo alguns meios para este efeito, consoante o tipo de células (Mcfarland, G.A.et Holliday, R,1999; Bodnar, A g. et alii, 1998).

As células geneticamente modificadas quando sujeitas a cultivo intenso e a selecção clonal são penalizadas quanto á sua eficiência para produzir animais viáveis após a N.T., referindo-se até que a sua percentagem de êxito (em fibroblastos somáticos submetidos à transgénese e depos utilizados para N.T. em ovinos e suínos) se situa nos 0-0,5% (Denning, et Priddle H3, 2003) (percentagem de embriões reconstruídos que originam animais jovens sobreviventes -Wilmut, I et alii, 2002) enquanto nas células dadoras de núcleo sem modificações genéticas este sucesso oscila entre 0 e 4% (percentagem de embriões reconstruídos que originam animais jovens sobreviventes -Wilmut, I e Peterson, 2002), sucedendo ainda que estes animais sobreviventes apresentam uma gama de anomalias cardiovasculares, hepáticas, renais ou placentárias (De sousa, P.A. et alii,2001, Wilmut, I et alii, 2002).

No quadro seguinte podemos verificar em mais pormenor alguns exemplos a este propósito, quer em ovinos , quer em suínos utilizando como alvo diversos tipos de genes, e por vezes o mesmo tipo de genes em diferentes espécies animais, ou na mesma espécie animal.

Percentagens (em relação ao número de embriões reconstruídos)
da progressão do desenvolvimento de fibroblastos somáticos primários gene "targeted"
em diversos genes, após N.T.(Denning, C. et Priddle, 2003)

Gene "target"	Embriões reconstruídos	Blastocistos	Fetos aos 60dias	Animais nascidos	Animais sobreviventes
Ovinos COL1 A1 PrP GGTAI	 417 454 265	 80(19,2%) 47(10,3%) 55(20,7%)	 20(4,8%) 8(1,8%) 7(2,6%)	 14(3,4%) 3(0,7%) 0(0%)	Mais de 6 meses 2(0,5%) 0(0%) 0(0%)
Suínos GGTA1 GGTA1	 3104 2513	 28(0,9%) 11(0,4%)	 9(0,3%) __	 7(0,2%) 5(0,2%)	sobreviventes 4(0,1%) 5(0,2%)

Gene COL1 A1= _ 1 (I) procolagénio

PrP= proteína priónica

GGTA=1= _ (1,3) - galactosiltransferase

São pois necessários métodos mais eficientes para obter modificações genéticas em ordem a tornar menos necessárias as duplicações, (multiplicações) das populações celulares, utilizando portanto uma menor capacidade proliferativa dessa população celular, deixando portanto o núcleo somático dessas células com mais possibilidades para ser convenientemente reprogramado.

Para a N.T. ter êxito, torna-se necessário que o núcleo doado, após uma breve exposição. ao citoplasto do oócito receptor do núcleo,possa ser reprogramado para um estado semelhante ao embriónico. Esta última situação implica uma perda de cerca de 85% de proteínas do núcleo doado simultâneamente com uma tomada substancial de proteínas do citoplasto do oócito (Gurdon, J. B. et alii, 1979).

As principais alterações modificações ocorridas ao nível do núcleo têm sede na estrutura da cromatina e nos seus perfis de metilação.

São conhecidas algumas etapas desta reprogramação remodelativa, sabendo-se, por exemplo que nas células epiteliais de Xenopus, a enzima ISWI adenosina trifosfatase (ATPase) nucleossomal é importante na remodelação da cromatina (kikyo, N. et alii, 2000) e que a Oct 4, uma proteína produzida durante os primeiros desenvolvimentos é também importante na reprogramação do genoma de timocitos.

Há sugestões da tomada pelos núcleos, de factores de transcrição, indução da remodelação do complexo de cromatina, acetilação de histonas, etc., o que parece levar a admitir que é possível pré-tratar as células somáticas com factores desta reprogramação antes da transferência de núcleos (N.T.).

A reprogramação funcional de fibroblastos "in vitro" utilizando extractos nucleares e citoplásmicos derivados de outro tipo de células somáticas está assinalada (Häkelien, A. M et alii, 20002) tendo sido verificada a tomada pelo núcleo e o assemble de factores de transcrição, a indução de actividade do complexo remodelador da cromatina, a acetilação de histonas e a activação de genes específicos da célula.

Esta experiência comprova a possibilidade de produzir células isogénicas de substituição para aplicações terapêuticas.

Noutras estratégias visando melhorar a eficiência do gene "targeting" nas espécies pecuárias, pode-se pensar em proceder por exemplo ao "Knockdown"de genes através da redução do tamanho do gene em vez de o eliminar, ou recorrendo ao RNAi, ou ainda utilizando vectores recombinantes reputados como mais eficientes.

Em certas circunstâncias como por exemplo na construção de modelos experimentais de ovino para o estudo da fibrose quística, pode ser de preferir reduzir o tamanho do gene funcional em vez de o eliminar (Denning, C. et Priddle, H, 2003).

Também a expressão, em diversos eucariotas , de mRNA codificado no núcleo pode ser fortemente inibida pela presença de RNA de cadeia dupla(ds RNA) ou seja RNA de interferência (RNAi) correspondente ás sequências de exons no mRNA(Paul, C. P et alii, 2002). Com efeito em sistemas mamíferos curtas regiões de RNA de dupla hélice e com menos de 30bp de comprimento são recrutadas pelo complexo silenciador induzido pelo RNA, originando uma quebra especifíca do RNA homólogo o que é conhecido como interferência RNA (RNAi) (Hammond, S M et alii, 2001).

Este sistema RNAi ainda não foi testado em espécies pecuárias onde, se tiver êxito, poderá servir para o "Knockdown" de genes nestes animais (Denning C. et Priddle, 2003).

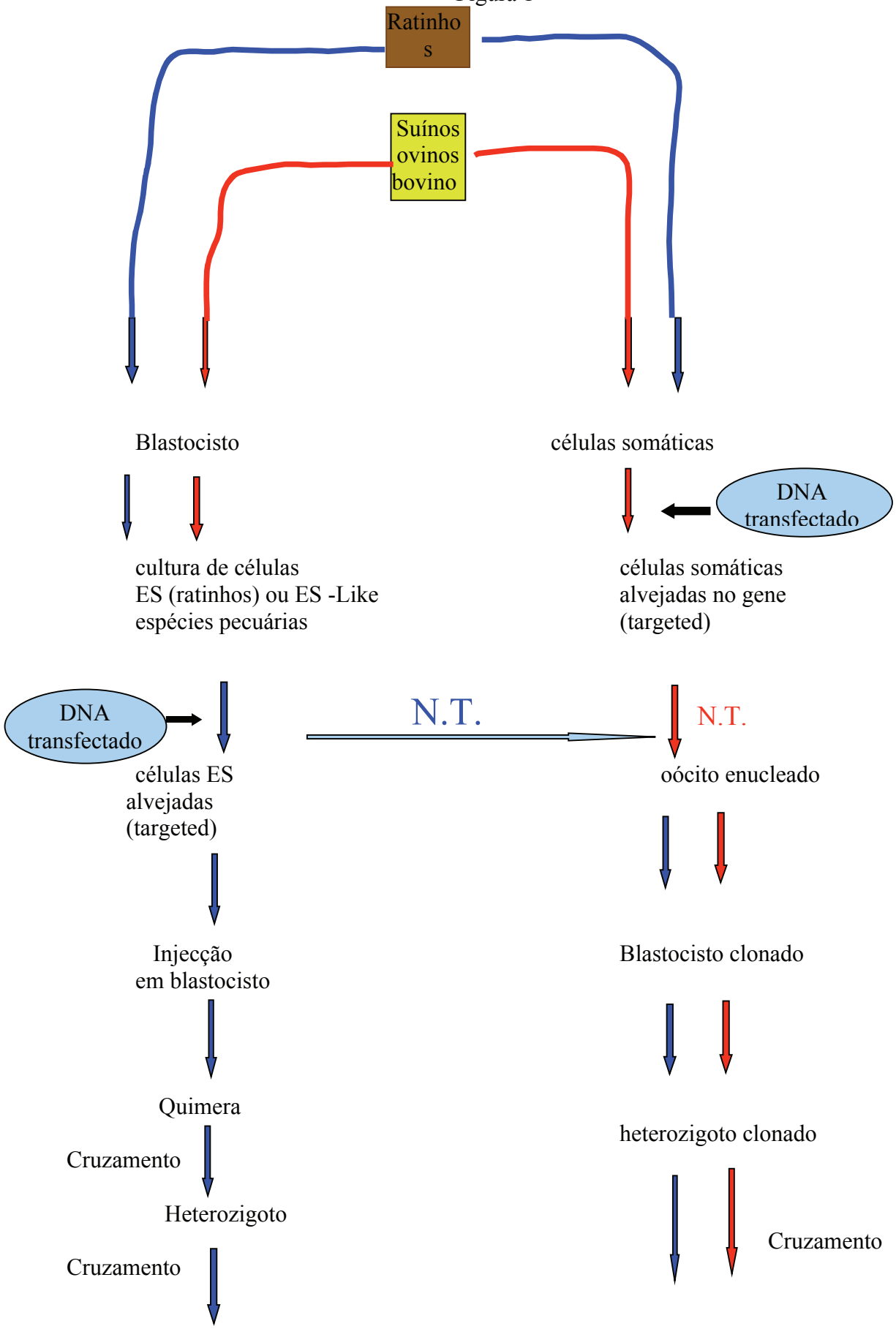
Também vírus recombinantes, adeno associados, para a inserção de transgenes funcionais em outros genes,têm sido reportados como tendo uma alta eficiência (até 1% das células em culturas), embora com a limitação de 4kb no tamanho da sequência nucleotidica inseridos.

Gene "targeting" nos animais

Na figura 1 seguinte esquematizam-se comparativamente as estratégias para gene"targeting" com sucesso em ratinhos e em espécies pecuárias (suínos, ovinos, bovinos)(Denning, C. et Priddle, H, 2003)

Gene "targeting" nos animais

Figura 1



Homozigoto

Vias de injecção de blastocisto	Vias de transferência de núcleo (N.T.)

Na figura anterior as etapas realizadas com êxito para o gene "targeting"em ratinhos são marcados a azul e nas espécies pecuárias (suínos,ovinos,bovinos) são marcados a vermelho.

Assim nos ratinhos é possível obter heterozigotos através de injecção de transgenes em blastocistos (à esquerda na figura) ou por transferência de núcleo (N.T.), à direita na figura, enquanto nas espécies pecuárias apenas se obtêm por N.T..

Esta última situação resulta de nas espécies pecuárias as células estaminais embriónicas (ES) extraídas dos seus blastocistos, muito rapidamente se diferenciam e pararem de se multiplicar sendo pois células ES-like não se constituindo em linhas de células estaminais embriónicas susceptíveis de serem transfectadas com DNA exógeno e permitirem as etapas subsequentes que levam à produção de animais transgénicos.

Salienta-se também que no caso do ratinho a obtenção de células somáticas para gene"targeting" não tem sido alcançada o que leva à utilização da N.T. a partir das células estaminais embriónicas (ES).

Com já referimos, e voltaremos mais adiante a abordar, a homozigotia pode ser obtida por cruzamento adequado entre os animais produzidos ou pelo isolamento de células com um gene targeted de um animal clonado, rompendo depois nestas células o segundo alelo e utilizando-as seguidamente para N.T.(Phelps, C. J. et alii,2 003).

O isolamento de linhas de células estaminais embrionárias nas espécies pecuárias, repete-se, ainda não foi conseguido, mas quando isto suceder e se alcançarem células estaminais embriónicas com características similares às dos ratinhos será possível obter uma vida mais longa nas populações celulares, mais elevada eficiência nas recombinações homólogas, bem como a formação de linhas germinativas nas quimeras, podendo nestas circunstâncias a modificação genética das espécies pecuárias ser alcançada utilizando celulas estaminais embrionárias inoculadas nos blastocistos, ou então por transferência nuclear (N.T.) dado que estes dois sistemas são já hoje utilizados no ratinho (Rideout, W.M 3rd, et alii,2 002).

5 – ALGUNS ASPECTOS PECULIARES DA TRANSGENESE NOS ANIMAIS (FAO/WHO EXPERT CONSULTATION ON THE SAFETY... ROME, 17-21 NOVEMBER 2003, REPPORT)

No que se refere à transgenese, com excepção de animais de espécies pecuárias utilizados para a produção da produtos farmacêuticos através do leite, não há animais destas espécies pecuárias a serem produzidos à escala comercial em qualquer parte do mundo e admite-se que assim continuará a ser durante vários anos (Harper, G.S. et alii, 2003).

Contudo, carpas e salmões transgénicos são os animais mais perto da comercialização(Harper, G.S. et alii, 2003).

Pode dizer-se de uma maneira geral que a produção de espécies pecuárias transgénicas se encontra ainda à escala laboratorial.

Os animais transgénicos, ou seja animais geneticamente modificados, são animais que possuem DNA recombinante.

Nos animais terrestres e aquáticos possuindo DNA recombinante o seu material genético normal foi modificado "in vitro" através de técnicas que actuaram sobre os ácidos nucleicos, e o DNA recombinante foi injectado directamente no interior das células ou organelos ou então transferido através da fusão de células adequadas. São pois técnicas que não são usadas tradicionalmente no melhoramento animal e que ultrapassam as barreiras reprodutivas fisiológicas naturais.

Por transgene (tg) entende-se o DNA recombinante que foi integrado no genoma do animal geneticamente modificado.

Como já referimos, existem diversas técnicas para transferir genes para os animais, diferindo elas consoante a sua adequação para uma dada classe de animais ou o seu poder de transformação (Houdebine, L.M., 2002).

É claro que a utilização de um dado gene a transferir, depende do conhecimento do gene codificador do produto implicado numa característica específica de interesse no animal.

O gene a transferir é incorporado num vector da sua expressão, vector esse que também contem os elementos genéticos para controlar a expressão desse gene.

Como já vimos há diversos tipos de vectores com características variadas, a utilizar consoante as diversas classes de material genético a transferir e dos animais receptores.

O material genético a transferir para um dado hospedeiro, pode ser de uma das categorias seguintes (FAO/ WHO, 2003):

a) Gene para fusão, ou seja, um gene que codifica um produto de interesse com um elemento que regulará a sua expressão no hospedeiro.

b) Transposão, ou seja, um elemento(porção) de DNA capaz de se excisar a si próprio de um dado local do genoma e depois inserir-se noutro local do mesmo genoma, transposão esse que foi modificado em ordem a conter o gene de fusão pretendido.

c) Retrovírus, ou seja, um vírus que se pode integrar a si próprio no genoma e depois ser expresso pelo aparelho de replicação da célula hospedeiro, retrovírus esse que foi modificado em ordem a conter o gene de fusão pretendido. Ultimamente surgiram como vectores para transgenes, cromossomas artificiais que permitem veicular fragmentos de DNA bastante grandes 1Mb (um milhão de pares de bases) ou mais, que são autónomos replicando no citoplasma das células hospedeiras podendo transmitir-se através das linhas germinativas com sequências que o regulam, possuindo um centrómero, dois telómeros e origens de replicação (Harper, G.S., et alii, 2003). Enquanto os BACs (cromossomas bacterianos artificiais) podem transportar até 100Kb e os de leveduras YACs, centenas de quilobases,os cromossomas artificiais de mamíferos (MACs) podem transportar milhões de bases. Estes vectores cromossomais artificiais têm a vantagem de permitir transferir grandes transgenes e a desvantagem de ser difícil a manipulação de grandes segmentos do DNA do transgene (Kasinathan, R. J. M. et alii, 2003).

Estes vectores de expressão podem conter genes marcadores, alguns dos quais são simples sinais indicativos de que a transferência do gene em causa ocorreu com sucesso, outros vectores possuem genes que codificam produtos que através da sua identificação (por ex: antibióticos) permitem seleccionar os

indivíduos em que a transferência do gene em causa teve êxito.

Para que qualquer manipulação transgénica nos animais tenha sucesso é necessário o transporte do DNA transgene através da membrana plasmática da célula receptora e o transporte depois desse DNA através da membrana nuclear dessa célula, para alcançar os cromossomas seguido da sua incorporação num cromossoma de forma a permitir a sua transmissão à linha de células germinativas, com o novo gene exprimindo-se de forma controlada.

De entre todos os métodos habituais para introduzir o vector de expressão no hospedeiro a microinjecção de embriões com o transgene, apesar de todos os seus defeitos, continua a ser utilizada para a produção de animais transgénicos, inclusive com a ajuda de enzimas de restrição para mediar essa integração no genoma receptor (Thermes, V. et alii, 2002).

Com esta metodologia da injecção física da solução contendo o transgene, no pronúcleo de zigoto, foi calculado já em 1992 (Wall, R.J. Et alii, 1992), que gerar uma vaca por este processo custaria cerca de 500,000 dolares USA.

Dado o seu inegável interesse reproduzimos com adaptações, seguidamente, a partir de um relatório FAO/WHO de 17-21 November, 2003, alguns exemplos de possíveis vantagens alcançáveis através da transgenese de diversas especies animais.

Essas aplicações das transgeneses ás diversas espécies animais podem visar a melhoria das suas produções quantitativas e qualitativas, ou a obtenção de novos produtos biológicos ou a construção de animais que possam ser sentinelas-indicadoras de certos tipos de poluição, e ainda a defesa da saúde das pessoas e animais, inclusivamente através de certos tipos de biocontrolo.

Os objectivos da transgénese nos animais podem consequentemente ser muito diversificados.

Objectivo	Finalidade da manipulação genética	Exemplo de gene manipulado	Exemplos de espécies animais envolvidas
Melhorar a produção animal	Crescimento mais rápido ou melhores índices de conversão alimentar	Hormona de crescimento	Salmão do Atlântico Carpa comum Tilápia do Nilo
	Aumentar a resistência ás doenças	Lactoferrina Cecropina	Carpa Peixe galo
	Suportar baixas temperaturas	Proteína anti-congelante	Salmão do Atlântico Dourada
	Melhorar a digestibilidade dos alimentos	Fitase	Suínos (ou para adaptar os peixes carnívoros com dietas vegetais
Melhorar a qualidade dos produtos	Alteração dos perfis nutricionais	Reduzir o teor da lactose	Leite
	Remover alergenios dos alimentos	Knockout da proteína alergénica dos camarões	Camarões
	Novos animais ornamentais	Proteínas fluorescentes	zebrafish
Obter novos produtos	Produtos farmacêuticos	Anticorpos monoclonais, lizozima, GH, insulina, etc	Leite, Sangue, Ovos
	Produtos industriais	Fio de seda da Aranha	Leite
Bioindicadores	Sensores de poluição	Expressão de genes assinalantes ligados a promotores metalotionina expostos a metais pesados	Peixes de água doce pequenos (Fundulus)
Saúde humana	Células, tecidos e órgãos para transplantes	Galactosil transferase	Suínos
Saúde animal	Prevenção de prionóses	Knockout do PrP	Bovinos, Ovinos
Biocontrolo	Controlo das pestes por insectos	Introdução de resistência aos pesticidas	Insectos
	Controlo de transmissão de doenças (malária)	Resistência ao parasita Plasmodium no mosquito Anopheles	Insectos
	Controlo reprodutivo e sexual	Gene anti-sense para a GnRH ou aromatase	Espécies exóticas invasoras

A introdução de um transgene num animal é um processo que não é controlado com precisão e daí poderem surgir uma série de consequências no que se refere à integração desse gene no hospedeiro, á sua expressão e á sua estabilidade.

O ideal seria ter uma única cópia do transgene num único local do genoma receptor, numa integração que fosse estável (FAO/WHO, Report, 2003). Mas o que sucede muitas vezes é a integração de várias cópias do transgene num locus, ou a sua inserção em múltiplos locais do genoma.

Por outro lado, a inserção do transgene num gene do hospedeiro pode inactivar este último (com as consequências inerentes) ou até afectar a expressão de outro gene ou genes.

Pode ainda suceder que o transgene antes de integrado no hospedeiro, pode modificar-se e deixar de ser funcional. Desejável seria que o trangene não desencadeasse efeitos indesejáveis sobre outros genes do hospedeiro.

O próprio transgene pode mesmo ser silenciado por metilação ou por outro meio.

O transgene pode ainda ter efeitos pleiotrópicos sobre diversas características dos hospedeiros. È o caso dos suínos, ovinos e peixes em que foram introduzidos genes da hormona de crescimento e que passaram a exibir uma série de anormalidades morfológicas ou metabólicas, embora outras pleiotropias possam ser positivas como é o caso do aumento de peso das carcaças.

A utilização de vírus e transposões como vectores de transgenese, levanta também a hipótese de estes poderem subsequentemente à integração, se movimentarem dentro do genoma.

As espécies animais de aquacultura estão particularmente vocacionadas para a produção de animais transgénicos.

O peixe e marisco são altamente fecundos, produzindo grande quantidade de gâmetas e em muitas espécies os ovos (relativamente grandes) e esperma podem ser colhidos e realizar-se a fertilização "in vitro", podendo os ovos fertilizados serem desenvolvidos fora do corpo, sem necessidade de mais manipulação ou re-implantação (Harper, S.G. et alii, 2003).

A primeira transferência de um gene num peixe ocorreu em 1985 na China (Zhu, Z. et alii, 1985), tendo depois disso sido gerados uma série de animais transgénicos de importantes espécies comerciais (Harper, S. G. et alii, 2003)-vide quadros adiante.

Também os crustáceos e bivalves são passíveis de técnicas transgénicas.

Na construção de transgenes para os peixes há já um grande número de genes que foram sequenciados, sobretudo os da hormona de crescimento, dispondo-se hoje de uma série de promotores utilizáveis para a construção destes transgenes que a princípio utilizavam genes aviários e mamíferos (Iyengar, A. et alii, 1996). Nestes promotores para os peixes, avultam os promotores metalotioninas que são induzíveis pelos metais pesados e regulados positivamente por estes. Mas hoje há já outros promotores disponíveis, como é o caso do promotor _-actina e o promotor proteína anti-congelante (APF).

De todas as espécies aquáticas transgénicas produzidas, sobressaem as transgénicas para a hormona de crescimento (GH) que induzem aumentos de crescimento notáveis. O salmão Coho (Oncorhynchus Kisutch) transgénico com o transgene APF-GH tem pesos 11 vezes maiores que testemunhas adequadas, havendo mesmo um exemplar em que esse aumento foi de 30 vezes e com velocidade de crescimento 60% mais rápida.

Curiosamente, estão descobertos métodos que permitem obter a esterilidade dos peixes/mariscos transgénicos, através da manipulação dos cromossomas (ploidia). Esta triploidia ou tetraploidia pode ser induzida nos ovos de peixes e mariscos aplicando pressão, temperatura ou choque químico logo após a fertilização normal, evitando-se assim a extrusão do segundo corpo polar. Os triplóides são geralmente estéreis permitindo assim a contenção da reprodução, embora a triploidia não assegure esta esterilidade a 100% (Lyons, R.L. Et Li. Y, 2002).

Esta triploidia tem sido induzida por choque térmico em tilápias transgénicas com a hormona de crescimento.

Nas técnicas específicas para a produção de peixes e mariscos transgénicos referem-se a electroporação, o bombardeamento com partículas e a transfecção mediada quimicamente (Buchanan, J.T. Et alii, 2001). A primeira delas é a mais adequada para transmitir os transgenes a um grande número de ovos. A electroporação de esperma ou gónodas antes da fertilização é também possível (Sin, FYT, et alii, 1993).

6 – IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÉNICOS E EXAME DA ESTABILIDADE DOS TRANSGENES (HARPER, G.S. ET ALII, 2003)

Como se compreende,nas diversas etapas que levam à construção de animais transgénicos é necessário dispor de meios analíticos que nos permitam acompanhar a eficácia e adequação ou inadequação das metodologias utilizadas para obter o tipo de animal transgénico pretendido.

No processo de construção de qualquer animal transgénico a identificação e caracterização do transgene e produtos da sua expressão no novo ser gerado, ou em algumas das suas etapas intermediárias, assume particular relevância para se saber do êxito ou inêxito dos processos imprimidos e das consequências e características daí resultantes.

Os métodos para produção, isolamento, identificação e caracterização dos ácidos desoxiribonucleicos, ribonucleicos e proteínas são básicos neste contexto.

Importa pois a identificação e caracterização do DNA recombinante transgénico, o que pode ser feito através de diversas metodologias, tal como avaliar se o transgene é ou não eficientemente transcrito, para o que se dispõe também de metodologias sensíveis, e ainda depois e finalmente ao nível da tradução proteica como se encontram as coisas não só nos aspectos estruturais mas também funcionais.

Assim para a identificação e caracterização da transgénese desencadeada pode passar-se pelas etapas da:

- Análise do DNA transgénico
- Análise da transcrição desencadeada pela transgénese
- Análise da tradução proteica expressa

Com efeito estas três etapas podem até estar desacopladas pois o transgene pode estar correcta ou incorrectamente inserido, total ou parcialmente, no genoma receptor, pode condicionar o funcionamento de outros genes desse genoma, pode ou não ser transcrito em quantidades normais ou anormais, e as proteínas expressas podem sê-lo correctamente ou não, e estar dotadas da funcionalidade pretendida ou não.

Para isto, são necessárias quantidades de materiais biológicos suficientes para esses exames, devendo as populações celulares transgénicas e pré-transgénicas nas suas diversas fases e etapas disporem de características culturais e multiplicativas adequadas para estes efeitos.

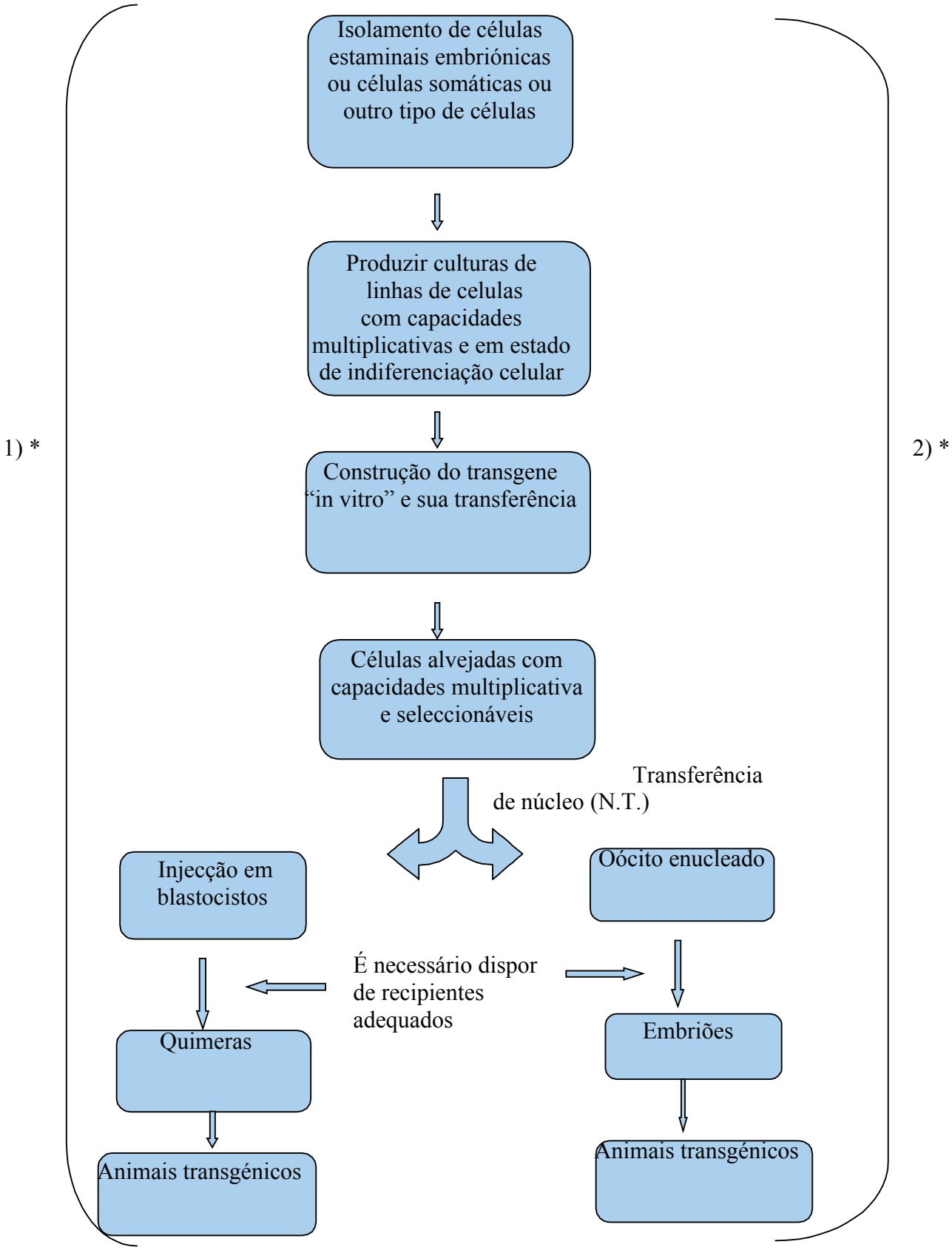
Por essas razões é muito mais difícil operar a transgénese nos animais do que a sua simples clonagem, até porque a clonagem pode ser uma das diversas etapas envolvidas na transgénese que envolve por outro lado a construção "in vitro" do transgene e a sua incorporação em veículos adequados que possam gerar embriões e animais transgénicos.

No esquema seguinte (figura 2) são referidas as etapas da transgénese por gene "targeting" nos animais, em que pode incidir a identificação e caracterização anteriormente referida.

Figura 2
Etapas na transgénese por gene targeting
em animais, em que pode incidir a
identificação e caracterização do transgene.

(Identificação e caracterização de genomas celulares, transgenes inseridos e/ou produtos da sua expressão).

Fig. 2



* 1) A identificação e caracterização pode ser feita em qualquer uma destas etapas.

* 2) É pois necessário dispor de células, linhas celulares, transgenes construídos "in vitro", blastocistos e/ou oócitos enucleados, fêmeas de aluguer, embriões, fetos e animais construídos, que podem ser objecto de identificação e caracterização.

As técnicas mais utilizáveis para identificação de animais transgénicos e exame de estabilidade dos transgenes estão referidas seguidamente:(Harper, G. S. et alii, 2003)

Para identificação do transgene

- Análise por Southern blot
- PCR
- Q-PCR
- Microscopia

Para análise da expressão ao nível da transcrição

- Northern blotting
- RT-PCR

Para análise da expressão ao nível da tradução

- SDS-PAGE e Wertern blotting
- Elisa
- RIA
- HPLC
- Imunohistoquímica
- Funcionalidade proteica

Vejamos algumas particularidades de algumas destas metodologias.

6.1 – Para identificação do transgene (tg)

O Southern blot consiste no isolamento, a partir das amostras em causa , do DNA, sua hidrólise com enzimas de restrição adequadas e posterior separação electroforética em gel de agarose, desnaturação dos fragmentos separados do DNA e sua transferência para membrana própria onde possa ser hibridado com sonda específica (complementar da sequência do transgene em causa) visualizável.

Consegue-se assim provar a presença ou ausência do transgene no DNA da amostra, bem como se ocorreu a sua integração num cromossoma e a posição relativa dessa integração, se ocorreu ou não recombinação homóloga, o número de cópias integradas do transgene e a sua estabilidade ao longo do tempo e através das gerações.

Este método analítico apesar de destronado pela PCR ainda é o melhor para identificar a posição da integração do tg dentro do genoma e a sua estabilidade ao longo do tempo.

A PCR consiste na ampliação rápida de determinadas regiões do DNA de uma amostra para a qual se dispõe de "primers", permitindo a identificação em 2-4 horas dos animais transgénicos, tal como permite a identificação do tg no sangue e noutros tecidos, detectando também mosaicismo dentro de um indivíduo.

A Q-PCR (real time PCR) tem as características analíticas da PCR mas acrescidas de ser também um método quantitativo.

A microscopia permite identificar vectores transgénicos no interior das células através da hibridação fluorescente "in situ" (Fish) permitindo averiguar do local cromossomal onde o tg foi integrado e a estrutura cromatínica deste local e ainda o efeito da integração do tg sobre a expressão dos genes.

6.2 – Para análise da expressão ao nível da transcrição

O Northern blotting implica o isolamento dos RNA das amostras, a sua separação electroforética por talhes moleculares e a sua transferência para membranas de nylon onde são hibridadas com sondas específicas visualizáveis (complementares do transcrito que se espera que seja expresso pelo tg). Permite semi-quantitativamente avaliar a expressão transgénica em diversos tecidos.

A RT-PCR permite obter c DNA a partir do RNA sendo um meio semi-quantitativo ou quantitativo para avaliar a expressão transgénica nos tecidos dos animais.

6.3 – Para análise da expressão ao nível da tradução

O conjunto de técnicas enunciadas anteriormente permite identificar se o tg produz ou não a proteína desejada.

Os SDS_PAGE e Western blotting permitem o isolamento das proteínas e a sua separação ou a sua transferência após isolamento para membranas (Western blotting) onde podem hibridar com anticorpos permitindo identificar a proteína de interesse e as suas características funcionais ou não funcionais no caso de proteínas truncadas.

As metodologias ELISA, RiA, HPLC e, histoquímicas visam os mesmos objectivos anteriores com metodologias e características um tanto diversificadas.

As provas de funcionalidade da proteína expressa pelo tg assumem particular relevância, como no caso de ser dotada de actividade enzimática.

7 – Estabilidade da expressão dos transgenes (tg) (Harper, G.S. et alii, 2003)

Na transgénese dos animais um dos principais obstáculos reside na expressão pobre ou não específica dos transgenes inseridos.

Cita-se o exemplo assinalado por Adams (Adams, N.R., et alii, 2002) que construíram um transgene da hormona de crescimento e que não foi expresso, apesar de existir, em um de três carneiros testados, tendo contudo a expressão da hormona sido normal nas gerações dos outros dois carneiros.

Por outro lado, há casos em que o efeito desencadeado pelo transgene declina ao longo do tempo no animal em que foi inserido ou na sua descendência. Esta situação está reportada para o transgene do IGF-1 inserida em ovinos (Damak, S. et alii, 1996) . Este transgene permitia produções de lã, 17% superior ás testemunhas, na 1ª geração, mas depois declinava na estação seguinte ou nos animais da 2ª geração.

A explicação para estas situações de silenciamento dos genes podem ser justificadas teoricamente pelas metilações do DNA do transgene ou pela desacetilação das histonas envolvidas, etc.

Há uma série de factores, quando se constroem os transgenes, que podem reduzir a expressão destes e daí se recomendar que não se utilizem nestas construções vectores com menos de 30kb de comprimento, nem com c DNA em vez de DNA genómico com intrões, e que se evitem também a integração de múltiplas cópias do transgene ou a utilização de genes bacterianos ou a presença de elementos silenciadores.

Há, por outro lado, várias condições que podem ser adoptadas para minimizar este silenciamento dos genes.

8 – SILENCIAMENTO DE GENES COMO UM MEIO QUE AMEAÇA A GENETERAPIA (BESTOR, T. H, 2000)

A inserção de DNA retroviral ou a incorporação de sequências repetidas nos mamíferos pode desencadear o silenciamento da transcrição das sequências inseridas, habitualmente por metilação do DNA em regiões reguladoras.

O mecanismo de silenciamento dos genes pode constituir uma dificuldade para a gene terapia, sendo por isso necessário desenvolver vectores que resistam aos mecanismos defensivos do hospedeiro e sejam eficientes na cedência e expressão.

A geneterapia normalmente apoia-se numa construção ou num vírus recombinante que dirigem a expressão do veiculado, num tecido particular.

São conhecidos casos em que o gene transferido apenas é expresso no início da actividade e depois declina a sua expressão sem que se perca o construído inserido que pode continuar a subsistir.

O silenciamento dos retrovírus vectores resulta na maior parte dos casos das defesas do hospedeiro contra os elementos transposáveis e retrovírus e daí o abandono deste tipo de vectores.

O silenciamento da transcrição a longo termo do DNA retroviral implica a metilação nos elementos promotores das citosinas, na posição 5.

Também a inserção de sequências repetidas pode originar o silenciamento dos promotores envolvidos na maioria dos casos devido a metilações.

O silenciamento após a transcrição também pode ocorrer ao nível do RNA, mesmo que a transcrição decorra com intensidade, sendo este fenómeno devido ao RNAi (RNA de interferência). Nesta situação um RNA antisense é produzido por uma RNA polimerase dependente de RNA e o contacto entre RNA sense e RNA antisense activaria a degradação específica de RNA (Bestor, T.H, 2000). A presença de RNA i em células mamíferas está identificada (Wianny, F et Zernicka-Goetz, 2000).

9 – MOSAICISMO
(HARPER, G. S. ET ALII, 2003)

O mosaicismo, ou seja, a expressão diversificada dos transgenes dentro de um único organismo é outro problema muito frequente nos animais transgénicos e se assume pouca importância nos peixes e nos ratinhos, em podem ser produzidos grande número de animais transgénicos e, destes, seleccionados os que veiculam o transgene na sua linha de células germinativas para reprodução posterior, já assim não sucede com as grandes espécies pecuárias, dado o pequeno número de animais gerados e a sua reprodução demorada e dispendiosa.

O mosaicismo pode surgir de diversas formas (Harper, G.S. et alii, 2003)), assim:

1) A inactivação da expressão do gene pode depender da sua posição num conjunto de células que produzem um determinado tecido.
Este estado de expressão ligada ou desligada é depois mantido através das futuras divisões celulares.

2) Um alto número de cópias do transgene e dos seus arranjos em tandem de cabeça com cauda, tornam o DNA mais susceptível a rearranjos e daí resultarem diferentes sub-conjuntos de células, podendo ocorrer o silenciamento da expressão do transgene num dado sub-conjunto de celulas.

3) A integração do transgene em cromossomas que se encontram em diversas etapas da sua divisão celular, como por exemplo na microinjecção do vector transgénico no pronúcleo a integração pode não ser imediata e se essa integração ocorrer durante o primeiro ciclo celular todas as células poderão ser transgénicas, mas se porventura essa integração ocorrer após o segundo ciclo celular, só 50% das células ficarão transgénicas e assim sucessivamente.

Chan, A.W.S et alii, 1999 referem que a integração do transgene antes ou depois da replicação do DNA em cada ciclo celular afecta a eficiência da transgénese.

Há, no entanto, alguns métodos que permitem reduzir o risco de mosaicismo (Harper, G.S et alii, 2003). Por exemplo:

1) O cruzamento selectivo de animais com mosaicismo em ordem a produzir descendência transgénica pura (Fletcher, G. et alii, 2002).

2) O rastreio para retirar embriões transgénicos com mosaicismo antes da implantação em fêmeas receptoras (Chan, A.W.S et alii, 1999).

3) A inserção do gene de cópia única por recombinação homologada (Bronson, SK; et alii, 1996).

4) A utilização de cromossomas artificiais com construções longas.

5) A introdução de vectores retrovirais em oócitos durante a metafase II da segunda meiose (portanto antes da fertilização), (Chan, AWS, et alii, 1998).

10 – DESCRIÇÃO SUCINTA DE ALGUMAS TRANSGENESES EM DIVERSAS ESPÉCIES DE ANIMAIS

A modificação de genes endógenos por gene "targeting" nos genomas animais é um objectivo difícil de alcançar nas espécies pecuárias por diversas ordens de razões. Assim, torna-se necessário conhecer as estruturas e as respectivas sequências dos genes estruturais e dos genes reguladores envolvidos. Em segundo lugar é necessário construir "in vitro" os vectores necessários com as estruturas implicadas contendo inclusive marcadores adequados.

Torna-se depois imperativo introduzir esses vectores construídos em populações celulares que resistam a essas operações e a todas as operações subsequentes visando a identificação ,selecção e subcultivação das populações celulares que contêm a modificação genética desejada.

Esta população celular terá que possuir uma esperança de vida compatível com diversas multiplicações subsequentes, sendo depois clonada nas espécies pecuárias em oócitos enucleados, gerando embriões a cultivar para depois serem transferidos para fêmeas recipientes preparadas onde devem ter capacidade para gerar fetos de termo e depois animais vivos com capacidade replicativa e mantendo as modificações genéticas imprimidas pelo vector construído.

Nos ratinhos o gene "targeting" pode ser efectuado em células estaminais embriónicas (ES) o que noutras espécies animais só é conseguido utilizando linhas derivadas de células somáticas primárias, uma vez que não se dispõe de linhas de ES nestas outras espécies animais (espécies pecuárias).

As modificações genéticas podem incidir, em genes silenciosos ou em genes activos, em mais do que um alelo do mesmo gene, ou mesmo em alelos de genes diferentes através de clonagens em série.

As diversas manipulações genéticas dos animais podem ser alcançadas de forma um tanto variada consoante os objectivos em vista e de acordo com o que referimos anteriormente.

Assim as manipulações que visam um aumento das produções animais têm sido feitas por introdução de um transgene novo correspondente a um único gene, resultando portanto num acréscimo de funções no novo ser gerado.

Certamente que muitos aumentos de produções animais serão da responsabilidade de diversos genes actuando em conjunto, sendo portanto situações poligénicas.

Simplesmente, estas situações poligénicas, estão muito mal identificadas e conhecidas não sendo por ora possível construir transgenes que veiculem "in toto" os genes implicados nestas situações poligénicas. Apesar de se tratar de situações poligénicas, há situações em que a manipulação monogénica se reflete indiscutivelmente nas produções animais.

Quanto ás manipulações genéticas que visam combater ou proteger de determinadas doenças as estratégias são normalmente outras.

Assim pode tentar-se evitar que a doença se instale como por exemplo no caso da BSE nos bovinos e para este efeito duas estratégias têm sido seguidas uma visando a deleção do gene indispensável PrP para que esta doença ocorra (Hwang, vide 10.1.2 e Denning); outra inserindo um gene PrP modificado e exaltado na sua expressão que impede que o PrP normal seja convertido em PrP anormal (Hwang, vide 10.1.2).

Noutras situações paralelas por exemplo para aumentar a resistência à mamite estafilococica consiste na

introdução no genoma bovina do gene da lisostafina (Kerr et alii,2001) , podendo a estratégia ser um tanto diversificada conforme se referiu anteriormente na manipulação genética dos animais e na geneterapia.

Damos seguidamente breve resumo de trabalhos recentes nestes domínios.

10.1- Transgenese em bovinos

10.1.1– Transgéneses em série em bovinos da imunoglobulina – e da proteína prionica (Kuroiwa, Y, et alii, 2004)

Objectivo

Impedir a expressão em bovinos do gene da imunoglobulina- _ (IGHM) e a expressão do gene da proteína priónica (PRNP)

10.1.1.1 – Células a utilizar

Linhas de fibroblastos fetais bovinos

10.1.1.2 – Algumas características da construção dos transgenes

Para o 1º alelo - IGHM+/- (IGHM +/-) . Contem a sequência truncada do gene IGHM +/+
Para o 2º alelo - (IGHM-/-). Contem outra sequência diferente truncada do gene IGHM +/- com outro marcador
Para o 3º alelo - PRNP+/- (IGHM-/- PRNP+/-). Contem sequência truncada do gene PRNP+/+
Para o 4º alelo - IGHM-/- PRNP-/-. Contem sequência truncada do gene PRNP+/- com outro marcador

Análise dos genomas

A confirmação da eficácia das transgéneses foi feita através da PCR, sequenciação subsequente e RT – PCR.

Kuroiwa,Y, et alii, 2004, conseguiram realizar a partir de células somáticas de bovino (fibroblastos em culturas primárias) uma série de gene "targeting" que levaram ao knockout de ambos os alelos de um gene silencioso nos fibroblastos [o gene bovino que codifica a imunoglobulina _ (IGHM)] e produzir vitelos knockout heterozigotos e homozigotos que foram depois num knockout subsequente alvejados (targeting) em ambos os alelos de um outro gene activo nos fibroblastos e codificador da proteína priónica bovina (PRNP) implicada na BSE, obtendo-se assim numa mesma linha genética,fetos com knockout homozigotos nos genes IGHM e PRNP.

Esta biotecnologia de gene targeting em série tornou dispensável em algumas etapas a transmissão pela linha germinativa das modificações genéticas complexas introduzidas.

Noutras espécies mamíferas, que não o ratinho, o gene targeting pode utilizar células somáticas primárias

seguido de clonagem embriónica (McCreath, K.J et alii, 2000; Denning, C. et alii, 2001; Lai, L. et alii, 2002; Yifan, D. et alii, 2002), sendo os embriões por vezes utilizados para produzir descendência clonada.

No entanto, como já referimos, as células somáticas relativamente ás ES de ratinho têm uma esperança de vida média relativamente curta e daí dificuldades para seleccionar as colónias de células adequadas alvejadas dada a baixa frequência de recombinações homólogas.

Por outro lado, genes que são transcriptionalmente silenciosos em relação a genes transcriptionamente activos, têm uma baixa frequência de recombinações homólogas sendo dificilmente seleccionados.

Genes transcriptionalmente activos são mais facilmente seleccionados tendo um gene promotor marcado que induza a expressão do marcador seleccionado.

Para aquilatar das consequências da modificação genética introduzida, ambos os alelos de um gene devem ser alvejados (targeted).

Nos ratinhos isto é conseguido levando ao cruzamento de animais (founder) knockout heterozigóticos a fim de produzir uma linha "inbred" de knockout homozigóticos.

Estes cruzamentos entre os animais para obter homozigotos em diversas espécies (bovinos, ovinos e suínos) é dificultada dado os longos períodos de gestação e os intervalos consequentes, além dos inconvenientes da consanguinidade.

Kuroiwa, Y et alii, 2004 desenvolveram um método rápido e aplicável para contornar esta situação, baseando-se este método na aplicação em sequência, do gene targeting por recombinação homóloga seguida pelo rejuvenescimento de linhas celulares através da produção de fetos clonados (vide figura seguinte).

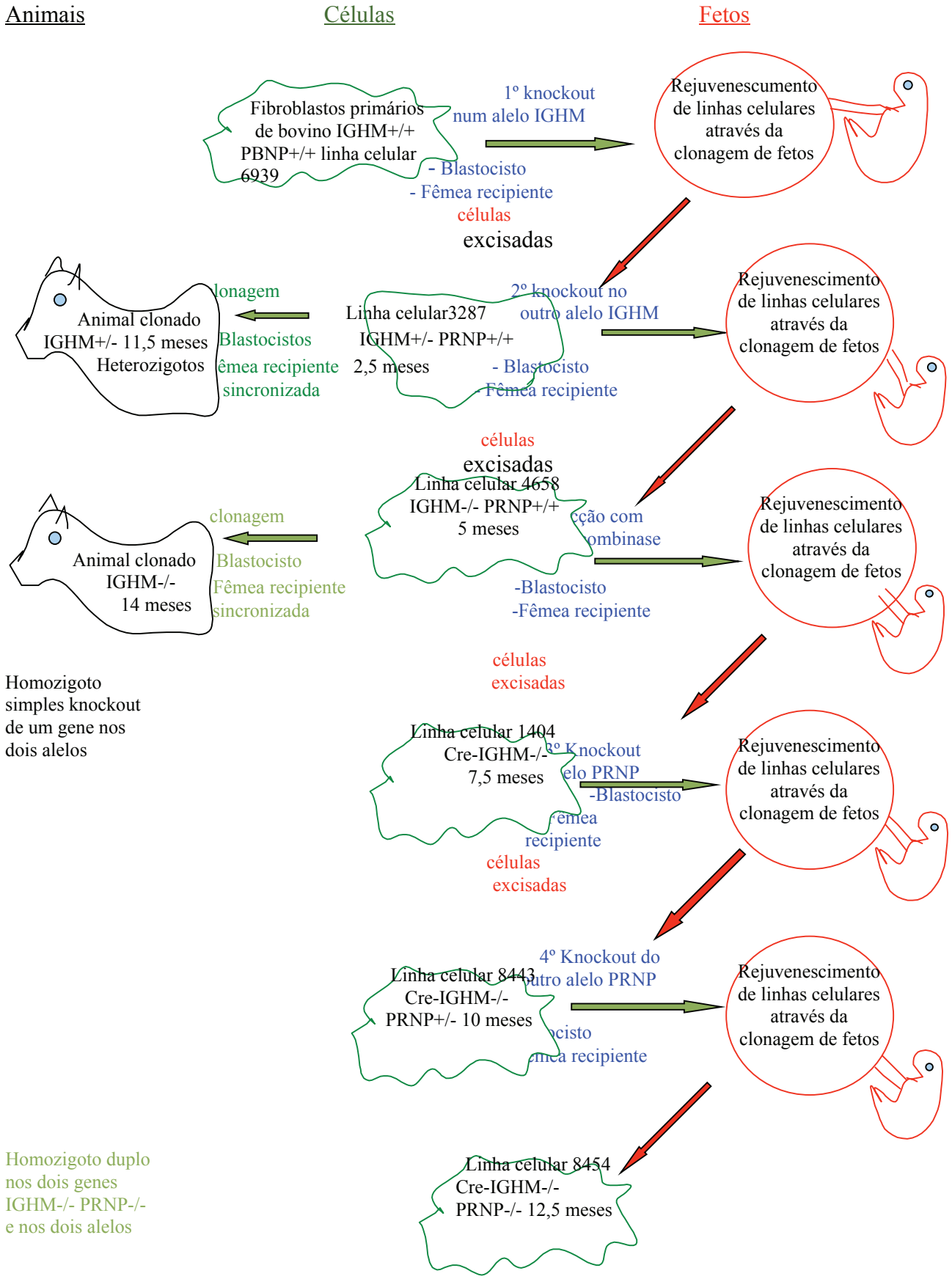
Conseguiram assim alvejar (targeting) um gene silencioso (não transcrito) e produzir vitelos heterozigotos e homozigotos para esse gene IGHM, tendo também modificado um segundo gene, o PRNP, produzindo bovinos e linhas celulares duplamente knockout e duplamente homozigóticas para dois genes diferentes.

Neste sistema de targeting genes em série, o tempo necessário para produzir um animal com estas características é notavelmente menor do que nos esquemas de cruzamento tradicionais.

Assim neste sistema de modificação de genes em série,cada modificação leva cerca de 2,5 meses para a transfecção e estabelecimento de linhas celulares modificadas podendo ser obtidos vitelos com estas modificações, e homozigóticos, em 14 meses (5 meses para o targeting nos dois alelos e 9 meses para a gestação, e vitelos com dois genes modificados e homozigóticos podem ser obtidos em 21 meses). (Kuroiwa, Y. et alii, 2004).

Nos bovinos, o cruzamento entre heterozigotos para produzir homozigotos, necessitaria de cerca de 5 anos e a geração de duas homozigotias a partir de duas heterozigotias é impraticável (Kuroiwa, Y et alii, 2004).

Figura 3
Esquema de processo para a modificação (gene targeting) em série, a partir de fibroblastos primários de bovino
(Kuroiwa, et alii, 2004)



Os fibroblastos fetais de macho bovino Holstein da linha 6939 foram electroporados com o 1º vector e depois de 14 dias em cultura, metade dos poços com células das placas de cultura eram rastreados por PCR para identificar as células correctamente alvejadas (IGHM+/-).

As células de dois poços restantes serviram para clonagem embriónica depois de por fusão com oócitos enucleados serem desenvolvidos in vitro até ao estádio de blastocistos, transferidos para fêmeas recipientes para gerar fetos que iriam rejuvenescer as linhas celulares. Aos 60 dias de gestação eram colhidos estes fetos e restabelecidas a partir deste as linhas de fibroblastos sendo confirmado pelo PCR que os fetos eram IGHM+/-.

Foram, por outro lado, também produzidos vitelos IGHM+/- com este genótipo confirmado por PCR e análise da sequência respectiva.

As linhas celulares de fibroblastos dos fetos com 60 dias de gestação foram depois alvejadas com o 2º vector e depois, rastreados através de novo marcador e depois analisadas na sua sequência, tendo-se obtido células knockout homozigóticas IGHM-/-.

Com estas células IGHM-/-, após fusão com oócitos enucleados e formados os blastocistos, foram gerados fetos para rejuvenescer as linhas celulares (através da transferência para fêmeas recipientes sincronizadas) e vitelos. Foram colhidos fetos IGHM-/- aos 45 dias e confirmada a sua marcação correcta pelo PCR e sequenciação.

A excisão nos fibroblastos IGHM-/- dos marcadores neo e puro utilizados nos dois vectores anteriores foi feita com o sistema de recombinação Cre- Lox P.

As linhas de fibroblastos 1404 Cre-excisada IGHM-/- foram transfectadas com o 3º vector e rastreadas por PCR.

As células Cre-IGHM-/- PRNP+/- identificadas foram utilizadas como referimos anteriormente para gerar fetos, e aos 45 dias de gestação foram colhidos novos fetos em que se confirmou por PCR e sequenciação que eram Cre-IGHM-/- PRNP+/-.

A linha celular 8443 Cre-IGHM-/- PRNP+/- foi depois transfectada com o 4º vector tendo a PCR e sequenciação confirmado Cre-IGHM-/- PRNP-/-.

No esquema da figura 3 anterior refere-se que através do sistema de modificação de genes um a seguir a outro, pode obter-se em 12,5 meses a homozigotia de dois genes diferentes, enquanto para se obter um animal heterozigoto apenas para um gene seriam necessários 11,5 meses e para obter um animal homozigoto para esse mesmo gene seriam necessários 14 meses, sem recorrer ao cruzamento entre animais, porque o recurso ao cruzamento de animais bovinos heterozigóticos para obter homozigóticos seria muito mais demorado.

10.1.1.3 – Construção de Transgenes e vectores

Neste trabalho que temos vindo a referir de Kuroiwa et alii, foram produzidos quatro vectores knockout para a clonagem dos quatro alelos a inactivar, dos dois genes endógenos IGHM e PRNP.

O 1º vector knockout para modificar o 1º alelo IGHM foi construído com um fragmento genómico de bovino à volta do exão 2 do locus da região constante do gene IGHM. Este fragmento em redor do exão

2 era depois sujeito a enzimas de restrição para se obter um fragmento de 7,2 kb homólogo da extremidade 5' da fracção do gene endógeno, e, com outras enzimas de restrição, para obter um fragmento de 2,0 kb homólogo da extremidade 3' da porção do gene endógeno, sendo os fragmentos subclonados em p- Bluescript II SK(-)Stratagene sendo depois nele inseridos genes relacionados com a puromicina (puro), Stop cassetes e DT-A (toxina difteria A)[Vector pBCu _ Ko puro].

O 2º vector para modificar o segundo alelo da IGHM já tinha outra construção, inclusivé com substituição do gene puromicina por um gene para neomicina (neo) [vector pBCu _ NKO neo].

Para a construção do 3º vector para um dos alelos da PRNP a estratégia era a delineada anteriormente com intervenção de enzimas de restrição com obtenção dum fragmento genómico bovino à volta do exão 3 do locus PRNP (subclonando um fragmento genomico Bam H1 de 8,3 Kb extremidade homologa 3' – e um fragmento Bam H1- Bgl II de 1,2Kb extremidade homóloga 5' em p Bluescript II SK (-)) e construção do vector, mas com o gene neo inserido [Vector pBPrP (H) Ko neo].

A construção do 4º vector para o segundo alelo da PRNP era similar à do 3º vector contendo no entanto o gene puro em vez do gene Neo.

Os vectores eram electroporados nos fibroblastos primários ou fetais que após replicação e por recombinação homóloga vão induzir a substituição do gene endógeno por fracções homólogas desse gene endógeno, veiculado pelo vector, em conjunto com marcadores adequados.

Esses marcadores vão permitir depois a identificação das células e das colonias que integraram no local preciso o transgene, em detrimento das células em que não ocorreu essa integração, ou em que ela ocorreu mas ao acaso e não nos locais precisos (homólogos) do gene endógeno.

As células seleccionadas eram tratadas com extratos mitoticos (Sullivan, E.J. Et alii, 2004) antes de fundidas com os oócitos enucleados.

Os genes endógenos IGHM e PRNP foram pois modificados sucessivamente um a um e alelo a alelo.

Assim nos fibroblastos primários de bovino foi primeiramente modificado com o 1º vector um alelo do gene IGHM. Estas células foram clonadas rejuvenescidas em fetos e estes depois originaram outra linha celular de fibroblastos que sofreu nova modificação com o 2º vector, no outro alelo do mesmo gene.

Antes da introdução do 3º vector as células homozigóticas para IGHM foram excisadas dos marcadores introduzidos pelos 1º e 2º vector, para a neomicina e puromicina, através de um plasmídeo com expressão de uma Cre- recombinase.

Novamente estas células agora homozigóticas para o gene IGHM foram clonadas e rejuvenescidas em novos fetos e estes originaram outra linha celular de fibroblastos que agora sofrem modificação com o 3º vector num alelo do gene PRNP gerando células heterozigóticas para este gene.

Estas células forma clonadas e rejuvenescidas em novos fetos e estes depois originaram outra linha celular de fibroblastos que foi modificada com o 4º vector no segundo alelo do gene PRNP gerando células homozigóticas para este gene.

As células permeabilizadas utilizadas neste trabalho de Kuroiwa, Y et alii, 2004 foram tratadas com extratos mitóticos para remodelação da cromatina (Sullivan, E.J.et alii, 2004) tal como se desenvolve seguidamente.

10.1.1.4 – Cromatina remodelada "in vitro" para clonagem de vitelos
(Sullivan, E.J. et alii, 2004)

Os núcleos das células somáticas dos mamíferos podem ser remodelados antes de serem transplantados para uma clonagem por N.T., o que parece ter diversas vantagens.

Neste sistema efectua-se a permeabilização da célula dadora do núcleo (por exemplo com estreptolisina 0 em solução tamponada) e o seu tratamento com extracto mitótico onde ocorreu a condensação da cromatina (num extracto celular mitótico) em ordem a remover os factores nucleares solubilizados durante a condensação dos cromossomas, seguindo-se a resselagem da membrana das células tratadas que continuam viáveis.

Os cromossomas condensados são depois transferidos para oócitos enucleados antes da activação, ou seja, as células resseladas são fundidas com oócitos enucleados e estes activados sendo depois os embriões cultivados.

O extracto mitótico neste trabalho (Sullivan, E.J. et alii, 2004) corresponde a células de rim bovino (American Type Culture Collection, Bethesda, MD) sincronizadas em mitose, com nocadazole, tratadas e colhidas e depois lisadas. Seguia-se nova homogeneização e centrifugação, constituindo o sobrenadante o extracto mitótico.

Esta transferência de cromatina comparada com o N.T. habitual parece oferecer maior percentagem de sobrevivência dos vitelos clonados, sendo compatível esta transferência de cromatina com o desenvolvimento pleno dos animais.

A desassemblagem nuclear "in vitro" é compatível com a subsequente reconstituição do núcleo funcional (Steen, R.L et alii, 2000).

Extratos de células mitóticas estão implicados na dessassemblagem de núcleos adicionados de fora, inclusive com quebra do envólucro nuclear e condensação dos cromossomas (Collas, P., et alii, 1999).

A condensação da cromatina durante a mitose "in vitro" está associada com a libertação de produtos ligados ao DNA como é o caso de enzimas remodeladoras da cromatina (Sif, S., et alii, 1998), factores de transcrição (como o TBP) e outros componentes somáticos potencialmente inibitórios).

10.1.2 – Bovinos resistentes à BSE

Na Coreia do Sul, país asiático ainda sem casos confirmados de BSE, o médico veterinário Prof. Woo-Suk-Whang e a sua equipa, anunciaram em 10-12-2003 que tinham produzido por engenharia genética , bovinos resistentes à BSE que foram transferidos para o Japão onde estão a ser testados durante um período de cinco anos (Cyranoski, D., 2003).

Esta clonagem foi feita inserindo certas células somáticas contendo um número anormalmente elevado de priões, em oócitos de vaca enucleados, sendo depois os embriões desenvolvidos em vacas de "aluguer".

Este número adicional de genes para a proteína priónica ainda podia interactuar com os priões infecciosos, mas resistia à sua conversão para a forma aberrante. Ao mesmo tempo era introduzido um promotor no DNA que estimulava a produção deste PrP alterado para valores bem acima dos normais, o que nestas circunstâncias diminuía a probabilidade dos priões infecciosos poderem encontrar e converter

o PrP normal (inibição dominante-negativa da replicação priónica) (Perrier, V., et alii, 2002).

Noutra estratégia para o mesmo efeito o grupo do Prof. Whang procedeu ao Knockout da totalidade dos PrP, em bovinos clonados, suprimindo assim a possível presença de proteínas priónicas normais.

Dado o alto impacto deste assunto, a construção dos transgenes para estas estratégias, bem como as biotecnologias utilizadas, tudo processos altamente sigilosos, foram protegidas por patentes internacionais rigorosíssimas.

Recentemente Richt, J. A, et alii, 2006 descreveram a produção de bovinos sem proteínas priónicas, através do processo de gene-targeting em sequência ou série realizada por Kuroiwa (co-autor do trabalho), tendo os animais por ora com 20 meses, revelado normalidade, clínica, fisiológica, histopatológica, imunológica e reprodutiva.

Os homogeneizados de tecidos cerebrais desses animais revelaram-se resistentes à propagação de priões através do PMCA (protein misfolding cyclic amplification) de Cláudio Soto (co-autor também deste trabalho) o que parece desde já indicar e confirmar a ausência de proteína priónica.

10.1.3 – Outros bovinos transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções

Gene introduzido ou deletado	Performance obtida	Referência
Lactase intestinal	Redução da lactose no leite	(Whitelaw, B, 1999)
Lisostafina	Resistência à mamite	(Kerr, D.E., et alii, 2001)
_- lactoglobulina	Aumento de produção desta proteína no leite	(Bremel, R.D., 1996)
Genes não identificados	Composição do leite modificada e reduzida acção alergénica no consumo humano	(Maga e Murray, 1995)
Genes não identificados	Aumento de resistência à tripanosomiase	(Mattioli, et alii, 2000)
Diversos, inclusive Anticorpos recombinantes e _ e K caseínas	Produção de proteínas modificadas	(Brophy et alii, 2003)

10.2 – Transgénese em suínos

10.2.1 – Alguns exemplos de transgéneses em suínos

Como já referimos aplicações práticas de transgenese nos animais podem envolver aspectos produtivos tais como o aumento da prolificidade e performance reprodutiva , melhoramento na utilização de alimentos e velocidade de crescimento dos animais, composição da carcaça melhorada, produção de leite e/ou a sua composição melhoradas e aumento da resistência ás doenças.

Abordamos mais adiante duas situações distintas de transgénese promovidas em suínos, num caso com introdução de um gene de outra espécie animal (bovino) para obter uma super expressão de _ -lactoalbumina, noutro caso com genes- targeting por Knockout de um gene do próprio suíno envolvido na genese de xenoantigénios causadores da rejeição hiperaguda aquando da trasplantação de órgãos ou tecidos para seres humanos.

Refere-se, seguidamente, uma aplicação da transgénese na produção de suínos visando a melhoria da produção e composição do seu leite com implicações evidentes.

Para esse efeito foram produzidos suínos transgénicos que super exprimiam a proteína láctea _ -lactoalbumina bovina.

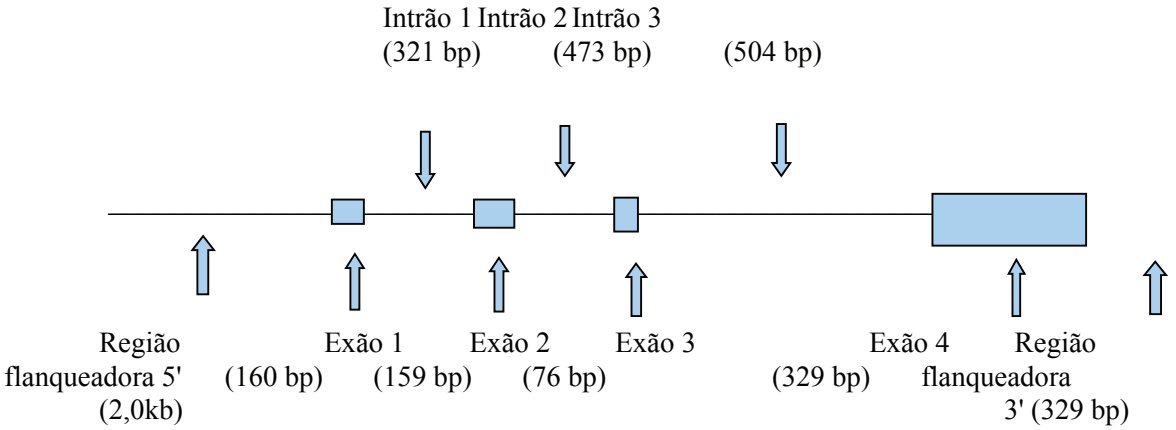
10.2.1.1 – Transgénese de _ -lactalbumina bovina em suínos (Bleck, G.T., et alii, 1998)

O objectivo era aumentar a produção de _ -lactalbumina no leite.

Os suínos transgenéticos eram obtidos através da microinjecção num pronúcleo do gene da _ -lactalbumina bovina que foi construído com a sua região flanqueadora 5' de 2,0 kb e com a sua região codificadora de 2,0 kb e 329 bp na região flanqueadora 3'. (Figura 4)

Figura 4
Estrutura do gene construído da _ -lactalbumina bovina para microinjecção

`



Para este efeito as marrãs eram preparadas convenientemente, com os animais exibindo estrus a serem inseminadas artificialmente e os embriões depois colhidos cirurgicamente a partir do oviduto e depois de visualizados os pronúcleos, apenas um pronúcleo era microinjectado com a construção de DNA anterior.

Os embriões injectados eram depois transferidos para fêmeas receptoras adequadas sendo os animais gerados, quando nasciam, rastreados utilizando a PCR através de biópsias da orelha e da cauda.

Os animais transgénicos eram caracterizados pela presença de uma banda de 700bp correspondendo a uma porção da região flanqueadora 5' da _ -lactalbumina bovina.

Por este meio originou-se um aumento cerca de 50% na concentração total de _-lactalbumina no leite da marrã através da lactação, tendo a proporção _ -

lactalbumina bovina/suína mudado ao longo da lactação o que parece indicar que o transgene bovino introduzido e o gene porcino endógeno tinham mecanismos de controlo distintos.

A expressão de transgenes especificamente na glândula mamária tem merecido particular interesse, pois as regiões flanqueadoras 5' de diversos genes de proteínas do leite, que têm uma função reguladora, podem ser utilizados para conduzir a expressão de proteínas estranhas nas células (Villote et alii, 1989) epiteliais mamárias dos animais transgénicos (Simons et alii, 1987).

Estas regiões reguladoras das proteínas do leite têm sido ligadas a genes expressos como transgenes em suínos, ovinos e caprinos (Clark et alii, 1989; Ebert et alii, 1991; Wall et alii, 1991).

10.2.1.2 – Produção de suínos deficientes em xenoantigénios

As transplantações de órgãos e tecidos dos animais, sobretudo de suínos, para os seres humanos é um objectivo que em princípio para ser alcançado necessita da remoção dos xenoantigénicos nos tecidos animais que desencadeiam reacções de rejeição hiperaguda nos recipientes.

Estes xenoantigénicos residem nos epitopes (Gal _ 1,3 Gal _ 1,4 Glc Nac-R) que existem na superfície celular de quasi todos os mamíferos e que não existem nos seres humanos e nalguns macacos (Galili, U. et alii, 1998 ref. in Phelps, C. J., et alii, 2003) sendo sintetizados pela enzima _ 1;3 galactosilotransferase (_ 1,3 GT ou GGTA 1).

As técnicas de transgénese que referimos seguidamente promovem o Knockout dos genes responsáveis pela síntese desta enzima.

10.2.1.2.1 – Clonagem transgénica em suínos para promover o Knockout de um dos alelos do gene da 1;3 – galactosilotransferase(1,3 GT)(Lai, L., et alii, 2002)

10.2.1.2.1.1 – Células dadoras de núcleos

Foram obtidos fibroblastos primários de fetos de suínos miniatura com 37 dias de gestação. Esses fibroblastos fetais resultaram da fina fragmentação de tecidos com digestão pela colagenase- tripsina.

As células assim dissociadas dos tecidos eram distribuídas numa determinada concentração por cm2 em poços adequados revestidos com colagénio e contendo um meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e antibióticos.

As células aderentes aos poços eram congeladas no dia seguinte.

Para transfecção esses fibroblastos fetais eram descongelados e cultivados durante três dias para que ocorresse subconfluência antes de serem transfectados por electroporação. [cerca de $2x10^7$ fibroblastos eram electroporados a 260 v num meio tamponado contendo o vector transgene construído (0,5p mol/ml)].

As células transfectadas eram depois cultivadas em globo, sem selecção durante dois dias e depois distribuídas em poços de placas revestidos de colagénio, cada poço com $2x10^4$ células e contendo um

meio de cultura adequado em consonância com os marcadores para selecção inseridos no vector construído.

Seguiam-se depois as operações de selecção e as células seleccionadas, ou sejam, as células dadoras de núcleos com o transgene eram criopreservadas e rastreadas por RT-PCR, e para isolamento e estudo do DNA.

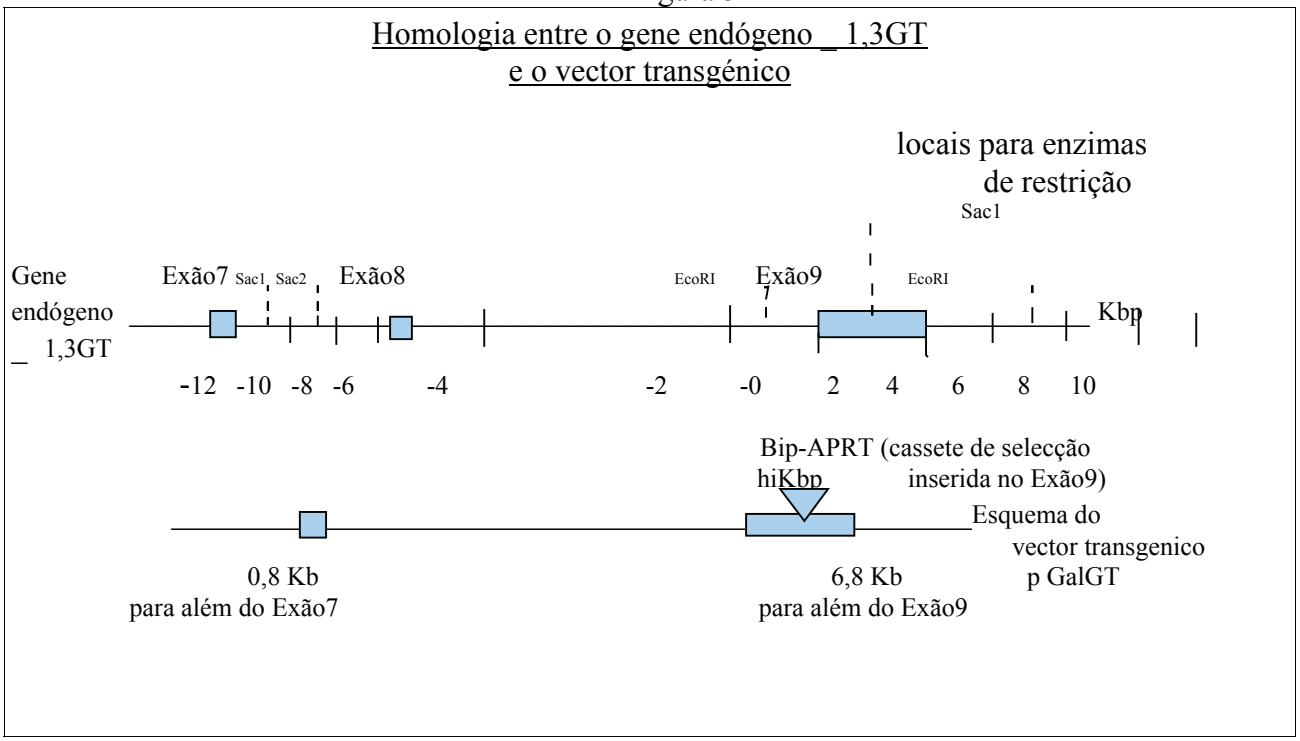
As células criopreservadas para a transferência de núcleos contendo o transgene, eram descongeladas a 37ºc, com a adicção do soro bovino fetal e esta suspensão mantida à temperatura ambiente 30 minutos, sendo depois utilizados para o transplante de núcleos.

10.2.1.2.1.2 – Construção do transgene

A construção do vector do gene para knockout continha sequências homólogas de determinadas regiões do gene endógeno _ 1,3 GT, assim como uma cassete de selecção contendo um local interno de entrada ribossomal, uma sequência codificadora de resistência a antibiótico e codões flanqueadores para stop.

Esta cassete de selecção era inserida num determinado local do exão 9 de domínio catalítico homólogo do gene _ 1,3 GT .

Figura 5



Para a substituição homóloga do alelo endógeno _ 1,3GTI (GGTA 1) foi utilizado um gene vector p GalGT com a região codificadora acima do domínio catalítico rompida pela inserção de uma cassete de selecção que continha um local de entrada Bip interno para ribossomas seguido por sequências codificadoras de resistência G 418.

10.2.1.2.1.3 – Oócitos como células receptoras de núcleos

Tentativas para utilização nas clonagens por N.T. de oócitos de espécies animais diferentes das células somáticas utilizadas como dadoras de núcleos não têm resultado, apesar de diversa tentativas referidas pela bibliografia da especialidade.

Os oócitos eram colhidos de marrãs abatidas no matadouro e maturados num meio protéico definido e suplementado com factores diversos, hormonas e antibióticos. Outros oócitos eram comprados num meio de maturação comercializado.

Após maturação os oócitos eram libertados das células cumulus envolventes e guardados num meio adequado até à sua utilização.

A enucleação dos oócitos decorria na metafase II e era feito num meio suplementado.

A transplantação do núcleo para o oócito, a fusão e a activação seguiram os protocolos indicados por Park et alii, 2001(referido in Lai, L., et alii, 2002).

A selecção das celulas a utilizar foi feita baseada na existência de uma plasma membrana intacta, pois dada a escassez de células contendo o transgene, não era possível outra selecção.

Os embriões eram guardados 30 a 60 minutos num meio apropriado suplementado e recobertos com óleo mineral. Os embriões sobreviventes (com a membrana plasmática intacta) eram escolhidos para transferência para mães de aluguer por cirurgia laparotómica.

A preparação das mães de aluguer seguia um protocolo indicado (Ref. 26 in Lai, L. et alii, 2002).

10.2.1.2.2 – Clonagem transgénica em suínos para knockout do 2º alelo do gene 1,3GT (Phelps, C.J., et alii, 2003)

Na produção de suínos deficientes em actividade _ 1,3-galactosilotransferase (_ 1,3 GTI ou GGTA 1) a completa remoção desta enzima dos órgãos suínos é uma etapa crítica para se alcançarem êxitos nas xenotransplantações.

Foi conseguido primeiramente (Lai, L., et alii, 2002)a rotura de um alelo do gene da _1,3 GT em suínos clonados.

Posteriormente(Phelps, C. J., et alii, 2003) a partir de suínos heterozigotos para este gene _ 1,3 GT (portanto com o 1º alelo inactivado) foi possível alcançar a inactivação do 2º alelo.

A inactivação deste segundo alelo foi causada por uma simples mutação pontual de T para G ao nível da segunda base do exão 9 do gene _ 1,3 GT e através de um processo de selecção baseado numa toxina bacteriana.

Fibroblastos fetais heterozigóticos knockout _ 1,3 GT foram isoladas a partir de fetos com 32 dias de gestação e construído um novo vector p PL 680 para knockout do 2º alelo _1,3 GT.

Este 2º vector que era electroporado nas células anteriores, continha um codão de partida ATG contendo também o gene neomicina.

O vector p PL 680 era constituído por três partes, uma de 1,8 kb gerada por PCR a partir de um fragmento do intrão 2 para o intrão 4 do gene _ 1,3 GT, terminando no codão de iniciação ATG na extremidade 5'. Tinha depois outra parte com uma região codificadora Neo/pA fundida no ATG da extremidade 5' e uma terceira parte de 9,6 kb gerada por PCR de um fragmento do exão 4 do gene _ 1,3 GT até ao exão 7, que constituiam a extremidade 3' do vector.

No que se refere ás condições de crescimento e selecção das células utilizadas, que foram fibroblastos fetais de suínos miniatura, o seu tempo de duplicação constante (steady) foi de cerca de 24 horas.

As linhas de clones celulares senesciam em média após 30 a 32 dias de cultura o que tornava necessário que as linhas clonais fossem seleccionadas para N.T. rapidamente.

Esta estratégia de clonagem com inactivação do gene _ 1,3 GT numa segunda volta (no 2º alelo) permitiu poupar cerca de 6 meses para obtenção da dupla inactivação dos alelos, em relação a outra metodologia pelo cruzamento natural dos animais que levaria cerca de 12 meses para produzir homozigotos com _ 1,3 GT inactiva (isto admitindo que se conseguiria suínos knockout heterozigotos macho e fêmea na mesma altura e que esses animais eram férteis.

10.2.2 – Outros suínos transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções

Gene introduzido ou delectado	Performance obtida
Factor T de crescimento insulina-like	Crescimento mais rápido. Gordura de carcaça melhor (Wheeler e Walters, 2001)
Hormona de crescimento porcino sob controlo de metalotionina	Crescimento mais rápido, menos gordura melhor índice de conversão (http://www.bresagen.com au/rep_bio.asp]
Desaturase stearoil CoA de espinafre	Aumento da gordura insaturada (Iritani, A, 2002) [http://news.bbc.co.uk/2/hi/asia-pacific/1780541.stm]
Fitase E.coli expressa na saliva	Redução nas perdas de fósforo, digestão de fitato e melhoria da digestão de dietas (Golovam, S.P., et alii, 2001)
Anticorpos monoclonais	Resistência à gastroenterite (Saif, L.J. et Wheeler, M.B. 1998)
Genes não especificados	Aumento da resistência a doenças Aumento do tamanho das ninhadas (Wheeler. et Walters, 2001)

10.3 – Transgenese em ovinos e caprinos Alguns exemplos de transgéneses em ovinos

Diversas modificações genéticas são orientadas para finalidades comerciais ou para aplicações médicas.

10.3.1 – Alfa-1-antitripsina humana (hAAT)

Assim a hAAT proteína plasmática que inibe a elastase evitando a excessiva destruição dos tecidos na resposta inflamatória, foi integrada, num DNA reconstruído, em ovinos transgénicos sendo expressa abundantemente no leite destes animais. (McCreath, K.J., et alii, 2000).

Para isto inseriram um transgene codificando hAAT na região 3' não translida de um locus _ 1 (I) procolagénio (COL1A1).

Esta estratégia implicava a inserção específica de um transgene mais do que uma delecção da sequência codificadora endógena.

10. 3.2 – PrP e GGTA1

Também Denning, et alii, (2001 a) conseguiram a produção de fetos ovinos e cordeiros com supressão (rotura) genética um alelo do gene PrP que codifica a proteína priónica responsável pelas TSE, e do gene GGTA1 que codifica a _ (1,3) – galactosiltransferase responsável pela apresentação à superfície extracelular das células de todos os ovinos da galactose – _ (1,3) galactose, provavelmente a causa princípal da rejeição hiperaguda dos órgãos dos animais xenotransplantados para seres humanos que não possuem este epitope (vide anteriormente a este propósito em suínos transgénicos).

10.3.3 – Factor IX da coagulação sanguínea humana

Em 1997 Schnieke et alii conseguiram transfectar fibroblastos ovinos com um DNA construído com o factor IX da coagulação sanguínea humana e seleccionar aqueles fibroblastos que continham uma expressão mais elevada para N.T. e que apesar de não terem as modificações específicas, geneticamente, num dado locus preciso do transgene, constituia no entanto a primeira prova de que as células podiam ser transfectadas, tornadas transitoriamente permeáveis ao DNA e seleccionadas enquanto se mantinham plenamente aptas para a N.T.. Isto permitia pois a modificação genética nas espécies pecuárias.

Schieke et alii conseguiram produzir o factor IX de coagulação humana no leite de ovinos transgénicos, através da transferência de núcleos de fibroblastos fetais transfectados com o transgene.

Os fibroblastos primários ovinos foram obtidos de fetos com sete dias. Estes fibroblastos dadores de núcleos eram induzidos para a quiescência e os núcleos transferidos para oócitos enucleados de ovinos.

O transgene construído p MIXI (ref. 16 in Schieke et alii, 1997) compreendia o gene humano para o factor de coagulação IX, contendo a região codificadora completa ligada ao gene promotor da _-lactoglobulina ovina que permitia um alto nível de expressão do transgene na glândula mamária ovina.

10.3.4 – Ovinos e caprinos transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções

Gene introduzido ou delectado	Performance obtida	Observação
Ovinos hormona de crescimento	Mais rápido crescimento Melhores índices de conversão menos gordura maior lactação	- Projecto a decorrer há já 20 anos na Austrália. - Em metade dos animais tem o gene da hormona inactivo - Capacidade reprodutiva levemente prejudicada (Kadokawa, H. et alii, 2003)
Ovinos Genes envolvidos na síntese de ácidos aminados com enxofre	Aumento do comprimento da lã talvez melhor crescimento do folículo e aumento do crescimento muscular na pastagem	Informação comercial confidencial (Bawden, C.S., et alii, 1999)
Ovinos IGF 1 com um promotor de ceratina	Aumento do crescimento da lã	(Su, HY et alii, 1998)
Ovinos Genes para ceratinas específicas expressas nos foliculos da lã	Propriedades da lã modificadas, com aumento do brilho e resistência	(Powell, B.C., et alii, 1994)
Ovinos invólucro do vírus Visna	Reduzida patologia devido a este vírus	(Clements, J.E., et alii,1994)
Ovinos PrP	Reduzida susceptibilidade ao Scrapie(TSE)	(Denning, C, et alii, 2001)
Ovinos Miostatina	Características musculares alteradas	
Caprinos Lisostafina	Cura ou previne mastite por Staph. aureus	(Fan, W., et alii, 2002)
Caprinos Estearoil- CoA dessaturase de ratazana	Aumento dos ácidos gordos insaturados no leite	(Murray, 2003 in Harper, C.S.,et alii, 2003)
Caprinos Lizozima humana	Modifica a composição do leite favorecendo as respostas imunológicas e inibindo bactérias nocivas	(Murray, 2003 in Harper, C.S.,et alii, 2003)

10.4 – Transgénese em ratinhos

Estão assinaladas modificações genéticas em ratinhos em mais de 2000 genes knockout (http://research.bmn.com/mkmd).

Através de modificações genéticas é hoje possível criar novas estirpes de ratinhos com mutações em virtualmente qualquer gene desejado.

Para isso:
1º – A mutação desejada é construída e introduzida por tecnologia do DNA recombinante numa cópia clonada do gene escolhido.

2º – A mutação é depois transferida para o genoma de uma célula estaminal enbriónica (ES) pluripotente de ratinho através de uma recombinação homóloga entre a sequência de DNA mutado e a sequência cognata de DNA do cromossoma da célula ES.

3º – É feita depois a microinjecção destas células ES contendo a mutação introduzida em blastocistos (outra hipótese como vimos anteriormente é a N.T. para oócitos enucleados).

4º – O embrião é deixado desenvolver até ao seu termo em mães de aluguer, sendo os ratinhos quiméricos gerados capazes de transmitir para a descendência as modificações genéticas introduzidas, depois de convenientemente cruzados e seleccionados.

É possível pois nestas circunstâncias escolher quais os genes que se pretende modificar e como fazê-lo.

10.4.1 – Murinos e galinhas transgénicos produzidos com o objectivo de melhorar as suas produções

Gene introduzido ou delectado	Performance obtida	Observações
Murinos lisostafina nas glândulas mamárias	Protecção contra a infecção estafilococica	(Kerr, D.E., et alii, 2001)
Murinos Esteraoil – CoA dessaturase	Aumenta os ácidos gordos insaturados no leite	(Murray, J.D., 1999)
Murinos thermocellium Clostridium endo glucanase E	Digestão da fibra em animais monogástricos	(Zhang, J.X. et alii, 1999)
Murinos Isocitrato liase e malato sintetase da bactéria E. coli	Introduzir o ciclo do glioxilato num mamífero em ordem a poder sintetizar glucose directamente a partir de acetato	(Saini, K. S, et alii, 1996)
Galinhas (frangos) invólucro do vírus da leucose	Aumenta a resistência à doença	(Crittenden, L. D. e Salter. DW, 1992)

10.5 – Peixes transgénicos(Rocha, A et alii, 2004)

Os peixes são muito mais fáceis de manipular transgénicamente do que os mamíferos pois cada fêmea produz muito maior número de ovos. Assim, por exemplo, a Zebrafish Danio rerio cada fêmea produz 200 ovos, o salmão Salmo Salar, 10,000 ovos por fêmea e a carpa Cyprinus carpio 100,000 ovos por fêmea. Por outro lado, o seu desenvolvimento embriónico ocorre exteriormente à mãe e a probabilidade de veicularem agentes patogénicos para os humanos é baixa.

Os métodos tradicionais para inserir o transgene construído têm sido a microinjecção do transgene nos ovos fertilizados, transgenes estes com fortes promotores virais que induzem contudo uma integração ao acaso nos genomas, e ainda algum mosaicismo e expressão episomica que se transmite de geração em geração, sendo portanto altamente imprevisíveis e com baixa taxa de integração.

Tenta-se no entanto ultrapassar estas metodologias recorrendo ao gene targeting e à recombinação homóloga, o que necessita de meios adequados para testar a eficiência dessas transgeneses. E o mesmo se passa quanto ao melhor conhecimento de possíveis células estaminais embriónicas nos peixes, bem como possibilidade de transferência de núcleos nestes animais.(Rocha et alii, 2004)

A microinjecção em ovos de peixe de DNA linear tem sido feita há já cerca de 20 anos em variadíssimas espécies tais como trutas, salmão, carpas, tilapias, medaka, dourada, zebrafish, loach e catfish (Lin, S; 2000). A maioria dos embriões dos peixes sobrevivem ás injecções, e 1% a 5% podem converter-se em transgénicos (Rocha, er alii, 2004). Após a injecção a percentagem de integração é baixa e a maioria dos transgénicos são mosaicos e daí a electroporação e bombardeamentos ensaiados.

Têm sido alcançados crescimentos mais rápidos, com a inserção de genes da hormona de crescimento humana ou de diversas espécies de peixes, em carpas, catfish,loach, tilapias, pik e em salmão do Atlântico e do Pacífico.

Na listagem destes animais transgénicos referido in table 2, Harper, G.S., et alii,2003, a construção do transgene utilizou sempre a hormona de crescimento, embora de diversas proveniências predominando no entanto a do salmão Chinock, sendo também o promotor utilizado nesses transgenes quasi sempre o mesmo com predominância do promotor AFP (proteína anticongelação) da lampreia oceânica (Oceanpout AFP promoter).

A transgénese propriamente dita foi feita pela microinjecção dos ovos fertilizados ou pela electroporação do esperma.

As espécies transgénicas vão desde as carpas, salmão, trutas, tilápias, sargos, lúcios, etc. e os ensaios foram efectuados em Israel, Canadá, China, Nova Zelândia, Finlândia, Cuba, Alemanha, Reino Unido, Formosa, Estados Unidos, Japão, Espanha e Coreia do Sul.

Em espécies de aquacultura transgénicas estão assinalados (table 3 in Harper, G.S., et alii, 2003) melhores índices de conversão, modificação da composição das carcaças, características morfológicas do intestino e cecum pilóricas aumentadas na área de superfície, etc etc.

No Canadá algumas empresas têm desenvolvido salmões transgénicos, mas levantam-se dúvidas acerca da sua inocuidade e impacto ambiental (Reichhardt, T., 2000).

Também tem sido tentada a transgenese com construções contendo AFP, visto que nem todos os peixes de importância comercial têm esta proteína anticongelante, mas os salmões em que tem sido realizada esta transgenese, o nível de expressão da AFP é baixo e insuficiente para conferir resistência à congelação

(Zhong, Q e Fan, T, 2002; Hew et alii, 1992).

10.5.1 – Peixes transgénicos para produtos biofarmacêuticos

No quadro seguinte (Rocha, A. et alii, 2004-) referem-se produtos biofarmacêuticos para uso humano produzido em peixes (Bostok, J., 1998; Coll, J.M, 2000).

Produto	Peixe	Companhia	Órgão alvo
Factor VII	Tilapia	Aquagene (USA)	Mucus
Insulina	Tilapia	P.C.ASMReD. (USA-Canadá)	?
Colagénio	Desconhecido	M.S.C.C.L (Japão)	?
Calcitonina humana Pleurocidina Defensinas humanas	Salmão Salmão Salmão	Diver Drugs(Espanha) Diver Drugs(Espanha) Diver Drugs(Espanha)	Mucus Mucus "

De qualquer forma, admite-se que no caso dos peixes (Rocha, A. 2004) para melhoria dos sistemas transgénicos e suas metodologias, se torna necessário aprofundar o conhecimento sobre as características das células estaminais embriónicas que têm sido isoladas de algumas espécies , inclusive com o estabelecimento de linhas celulares estáveis e que estão referidas em Zebrafish, Medaka e sargo.

10.6 - Transgénese Aviária

As biotecnologias transgénicas nas aves estão carregadas de dificuldades técnicas e apenas recentemente foram criados frangos transgénicos para alguns genes, o que não é encorajante para a poderosa indústria avícola por esse mundo fora, que aguardam que a tecnologia transgénica possa melhorar as produções de carne e ovos, e aumentar por outro lado a resistência ás doenças nos efectivos avícolas.

Por outro lado, as galinhas poedeiras podem ser explêndidos biorreactores para a produção eficiente de proteínas terapêuticas uma vez que a sua manutenção é barata, cada ovo pode produzir quantidades substanciais de proteínas, e o número de ovos produzidos ao longo do ano é substancial.

A branca típica do ovo contém 3,5 – 4,0 gramas de proteínas e mais de metade provem de um só gene (ovalbumina).

Admite-se que um gene expresso de uma proteína recombinante possa atingir até um grama ou mais de proteína expressa por ovo (Ivarie, R, 2003).

Há mais de uma década que se tentam desenvolver métodos para modificar o genoma dos galináceos, sobretudo a partir de 1995 quando diversas companhias de transgenesis aviárias entraram em cena. Alguns progressos foram feitos mas falta muito por fazer.

Recentemente foram referidas linhas de galinhas transgénicas produtoras na branca do ovo de interferão _ -2 humano, biologicamente activo, (Rapp, J. C et alii, 2003) e outras linhas de galinhas transgénicas

exprimindo o enzima bacteriano beta-galactosidase (estas últimas linhas foram produzidas na Universidade Estadual de North Carolina utilizando o vector retroviral SNTZ originalmente criado por T. Mikawa) (Mozdiak, P. E., et Petite, J.N., 2004).
No entanto a produção de aves transgénicas é uma tarefa muito complexa e laboriosa dadas as características das primeiras etapas de desenvolvimento embriónico e da sua fertilização que relembramos seguidamente.

O ovum maduro é libertado do ovário pela ovulação e o esperma armazenado na glândula hospedeiro deste esperma na fêmea ópera a fertilização quando o ovum entra no infundibulum do oviducto.

O ovo fertilizado entra no magnum que segrega o albumen, e depois entra no isthmus onde são depositadas as membranas externa e interior da casca seguindo-se a formação da casca na glândula da casca levando este percurso cerca de 3,5 a 4 horas. A formação da casca na respectiva glândula leva cerca de 20 horas.

A primeira divisão celular da segmentação ocorre quando da entrada do ovum na glândula da casca, continuando depois as divisões celulares enquanto a casca do ovo se vai formando e no momento da postura, o embrião tem cerca de 50,000 a 60,000 células sobre a superfície da massa da gema ou amarela (Spratt e Haas, 1960 in Mozdziak, P.E. e Petite, J.N., 2004).

Nas biotecnologias transgénicas nas aves uma das dificuldades consiste, no momento da fertilização, em obter e manipular os embriões, inclusive porque cada vez que se pretende obter ovos com uma célula, tem que ser abatida uma galinha adulta e daí a dificuldade de obter um número suficiente de ovos nestas condições.

Todas as metodologias para produção de aves transgénicas tem por objectivo a inserção do transgene em células que possam originar células germinativas, podendo assim essa inserção operar-se no oócito/espermatozoa maduros, ou no ovo recentemente fertilizado, ou nas células primordiais da linha germinativa durante a sua formação, ou a sua migração e colonização nas gónadas respectivas.

Em geral, a maioria destas técnicas produzem mosaicismo nas linhas germinativas (por exemplo, apenas um subconjunto de células das gónadas transportará o transgene), Daí a necessidade de rastrear eficientemente as linhas germinativas.

Sucede que o desenvolvimento das linhas germinativas começa com a formação de células germinais primordiais (PGCs) no embrião e que subsequentemente essas células migrarão passivamente através da circulação intra e extra- embriónica e migrarão activamente através da circulação sanguínea quando essas PGC migrarem para o epitélio seminal (Mozdiak, P.E. e Petite, J.N., 2004).

As PGCs(Primordial germ cells), celulas progenitoras dos gâmetas, sofrem pois um período transitório de circulação através dos vasos sanguíneos, seguido por uma migração activa através do mesênquima para a gónada em desenvolvimento (D' Costa, S., et alii, 2001).

As células PGCs podem ser obtidas a partir de sangue embriónico (Naito,M. Et alii, 1998; Zhao, D.F. E Kuwana, T. 2003) transfectadas “in vitro” por lipofecção e transferidas para embriões recipientes parcialmente esterilizados (Naito, M. et alii, 1998).

Como dissemos os alvos a atingir com o transgene, para modificação da linha germinativa, incluem o oócito maduro/ espermatazoa, o ovo recentemente fertilizado e células germinativas primordiais durante a sua formação, migração e colonização nas gónadas.

Uma das maiores dificuldades para inserção dos transgenes nas aves através da manipulação dos seus embriões é obter um grau de postura suficiente para conseguir um número adequado de descendentes GO susceptíveis de serem rastreados para aquilatar da incorporação do transgene.

Correntemente, para introduzir transgenes em embriões de aves as vias que têm permitido obter descendência são através de janelas abertas nos ovos e a cultura "ex. Ovo".

A abertura clássica da janela na casca para introdução do transgene e a sua posterior selagem origina baixas eclosões.

Os vectores retrovirais são comumente utilizados para introduzir genes estranhos nas linhas germinativas aviárias, mas muitos destes vectores são responsáveis pelo silenciamento da expressão dos respectivos transgenes e ainda com o inconveniente de poderem disseminar continuamente vírus no meio ambiente.

A microinjecção pode ser utilizada com grandes dificuldades técnicas em relação ao que se passa noutras espécies animais, e quando têm êxito nas aves origina um pequeno número de aves transgénicas.

A microinjecção em ovos recentemente postos é uma técnica muito mais difícil que nos mamíferos, uma vez que os ovos férteis das aves no momento da postura têm cerca de 50,000 – 60,000 células, e por isso não tem sido tentada esta microinjecção do transgene nestes ovos, mas sim em embriões férteis colhidos após o abate da galinha respectiva.

Estes zigotos microinjectados podem depois ser manipulados utilizando um sistema de cultura ex-ovo em três etapas.

Para criar galináceos transgénicos existem ainda tecnologias baseadas na célula, como por exemplo, ter por alvo celulas blastodérmicas, PGCs ou células estaminais embriónicas (ES), seguindo-se a implantação das células manipuladas num embrião em início de desenvolvimento, para criar uma linha germinativa quimérica.

Trabalhando com estas células é possível realizar a inserção do gene "in vitro", o que dá a possibilidade de examinar a integração do gene no genoma e a sua expressão antes das células manipuladas serem implantadas nos embriões.

Nesta situação a primeira etapa é obter culturas das células que sejam capazes de entrar na linha germinativa (é o caso das células germinativas primordiais ou PCGs), cultivá-las,transfeccioná-las com os construídos de DNA e depois implantá-las no embrião, produzindo portanto linhas germinativas quiméricas.

No entanto, e presentemente, as tecnologias retrovirais e a microinjecção são os únicos métodos utilizados para gerar aves transgénicas (Mozdziak, P e Petite, 2004).).

Recorda-se que as células estaminais pluripotentes aviárias referidas em cima são células indiferenciadas capazes de proliferar e de se renovarem a si próprias, possuindo portanto capacidade para se diferenciarem em todos os tipos de células somáticas e da linha germinativa. São pois excelentes meios para realizar a manipulação dos genomas, podendo ser derivadas de culturas de embriões aviários em início (Petite, J.N., et alii, 2004).

No contexto da genómica funcional aviária referem-se seguidamente uma série de patentes neste contexto

em que está envolvido o Prof. James Petitte (http://www.cals.ncsu.edu:8050/poultry/petitte.htm).

Patentes

Pardue, S.L, Petite, J. N., D'Costa, S. and Song, Y Methods for gamete production in birds Issued February 17, 2004,U. S. Patent # 6,691,638

Petitte, J.N., Ricks, C.A., Spence, S.E. Gene transfer in poultry by introduction of embryo cells in ovo. Issued: February 4, 2003; US. Patent # 6515199

Petitte, J.N., Ricks, C.A., Phelps, P.V., and Williams, C. Gene transfer in chickens by introduction of DNA into muscle in ovo. Issued: May 28, 2002; U.S. Patent # 6395901

Pardue, S. L. Peitte, J.N., and D'Costa, S. Methods for gamete Production in Birds. Issued: March 12, 2002; U.S. Patent # 6,354,242

Petitte, J.N.and Chang, I. Method of producing an Undifferentiated Avian Cell Culture using Avian Primordial Germ Cells. Issued: December 25, 2001; U.S. Patent # 6,333,192

Petitte, J.N. and Yang, Z. Veterinary Pharmaceutical Formulation Containing Avian Embryonic Stem cells. Issued: November 3, 1998; U.S. Patent # 5,830,510.

Petitte, J. and C. A. Ricks, Apparatus for Injecting Avian Embryo Muscle Tissue in Ovo, Issued: July 28, 1998, U.S. Patent # 5,784,992

Petitte, J.N. and Yang, Z. Avian Embryonic Stem Cells. Issued: August 12, 1997;U.S. Patent # 5,656,479

Petitte, J.N. and Yang, Z. Method of Producing an Avian Embryonic Stem Cell Culture and the Avian Embryonic Stem Cell culture Produced by the process. Issued: August 23, 1994; U.S. Patent # 5,340,740

11 – Produtos farmacêuticos produzidos por clonagem transgénica (adaptada de Strachan, T. et Read, A.P, 1999)

Produto	Processo patológico em que é aplicado
– Factor de coagulação sanguínea VIII	Hemofilia A
– " " " " IX	" B
– Eritropoietina	anemia
– Insulina	Diabetes
– Hormona de crescimento	Deficiências no crescimento
– Activador do plasminogenio Tíssular	Desordens trombociticas
– Vacina hepatite B	Hepatite B
– _ interferons	Hepatite crónica, leucemia celular
– _ "	Esclerose múltipla
– _ "	Infecção em doentes com granulomatose crónica
– Interleucina – 2	Carcinoma celular renal
– Factor Estimulador de colónias granulocito (G CSF)	Neutropenia Post quimioterapia
– Dnase (desoxiribonuclease)	Fibrose quística

A utilização de microorganismos ou de animais biorreactores para a obtenção destes produtos do quadro anterior depende de diversas circunstâncias e possuem diversas características, embora pareça desenhar-se uma maior vantagem na utilização dos animais biorreactores transgénicos construídos especialmente para este efeito, dada a tradução e posterior metabolização das proteínas expressas, ser mais vantajosa nos animais, bem como o isolamento e a purificação dos produtos obtidos.

As células animais são vantajosas relativamente ás células microbianas para efeito da produção de proteínas recombinantes ou sejam os animais transgénicos biorreactores.

No caso das proteínas recombinantes segregadas pelos animais através do leite, o transgene é construído contendo um promotor mamário específico, como pode ser o caso do gene da caseína.

No quadro seguinte referam-se uma série de proteínas recombinantes produzidas nas secreções de animais biorreactores.

Secrecção	Espécie Animal	Produto
Leite	Ratinha	- _ lactoglobulina de ovino (1987) -Activador do plasminogenio tissular humano (1987) - Hormona do crescimento humano (1987) -Urocinase humana (1992) -Fibrinogénio humano (1996) - Factor de crescimento dos nervos humanos(1999) -Spider silk (1999) - Hormona do crescimento humano(1994)
	Coelha Ovino Caprino	Eritropoietina humana (1996) antitripsina _ 1 humana(1991) Activador do plasminogênio tissular humano (1991)
Soro Sanguíneo	Coelha Suíno	- antitripsina _ 1 humana (1991) - anticorpos recombinantes (1991)
Urina	Ratinho	Hormona de crescimento humano (1998)
Sémen	Ratinho	Hormona de crescimento humano (1999)

Alguns exemplos de animais transgénicos que exprimem produtos farmacêuticos ou biomateriais utilizáveis em seres humanos ou para outras aplicações

Animal	Gene introduzido ou delectado	Performances alcançadas	Observações
Bovino	Genes de anticorpos humanos	São expressos no soro sanguíneo	(Robl, J.M. et alii, 2003)
Porcino	_ (1,3) galactosil transferase	Modificação da superfície celular, minimizando a rejeição hiperaguda dos órgãos transplantados para seres humanos	Vide texto e (Harrison, S.J., et alii, 2002; Ramsoondor, J.J. et alii, 2003)
Porcino	Hemoglobina humana	Expressa no sangue de suíno Purificada e utilizada com substituto	(Rao, M.J., et alii, 1994)
Ovino Ovino Ovino	_ 1- Antitripsina humana Activador do plasminogenio tissular humano Factor VIII humano	Expressa no leite purificado e utilizada no tratamento da fibrose quística e enfizema Expresso no leite, purificado e utilizado no tratamento de desordens na coagulação sanguínea	Vide texto Existem na Nova Zelândia cerca de dois mil animais destas linhas transgénicas
Caprino	Antitrombina III humana	Produzida no plasma sanguíneo, purificada e utilizada no tratamento de deficiência antitrombina nos humanos	(Baguisi, A. et alii; 1999)
Caprino	Fio de seda de aracnídeo	Expressa no leite, purifica-se (biomaterial)	Http://www.nexiabitech.com/
Murino	Hormona de crescimento de diversas espécies	Produzida na urina, sugerindo que a bexiga pode funcionar como biorreactor	(Kerr, D.E. Et alii, 1998)
Galinha (Frango)	Beta.lactamase bacteriana	Biorreactor: produção de proteína exógena na branca do ovo	(Harvey, A.J. E Ivarie, E, 2003)

12 - Número de animais transgénicos
na Austrália e Nova Zelândia
(Harper, G.S. et alii, 2003, table 4)

Espécie animal	Genes manipulados ou fenotipo modificado	Número de animais trangénicos
bovinos	_ e K caseína	64 animais (Nova Zelândia)
bovinos	_ s1 caseína	14 vitelos nascidos mas só um sobrevivente
Ovinos	_ 1- antitripsina	4.000 ovinos (Nova Zelândia)
Ovinos	Lã com outras características	Não revelado
Suínos	Xenoantigénios	30 suínos 4 marrãs grávidas para parir em Julho de 2003
Ostras	Esterilidade repressível	Cerca de 20.000 larvas

13 - Bibliografia

Adams, N.R. et alii (2003). The impact of a transgene for ovine growth hormone on the performance of two breeds of sheep. Journal of Animal Science 80, 2325-33

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomeck CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y 1999 Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat Biotechnol; 17:456-461.

Bawden, C.S. et alii (1999) Sheep transgenesis with Keratin and non-Keratin genes: expression in the wool folicle for modified fibre properties and growth rates. Experimental Dermatology 8, 342-3.

Bestor, T.H. (2000). Gene silencing as a threat to the sucess of gene therapy. J. Clin Invest 105, 4, 409-411

Betthauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilersten K, Enos J, Forsythe T, Goluecke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister- Genskow M, Srelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M. 2000 Production of cloned pigs from in vitro systems. Nat Biotecnol; 18:1055-1059

Bleck, G.T. et alii (1998). Production of bovine _ lactalbumin in the milk of transgenic pigs. J. Anim. Sci. 76; 3072-3078

Bodnar, A.G. et alii (1998). Extension of life span by introduction of telomerase in to normal human cells. Science 279, 349 - 352

Bostock, J. (1998). animal pharm's complete guide to aquaculture. In animal Pharm's Report of University of Stirling, Institute of Aquaculture. Richmond, Surrey, U.K., PJB Publications Ltd, pp 1:1-29

Bradley, J. et alii – (2001) . Molecular Medicine Second edition, Blackwell Science, p.51

Bremel, R.D. (1996). Potential role of transgenesis in dairy production and related areas. Theriogenology 45, 51-56

Brophy, B et alii (2003). Cloned Transgenic Cattle produce milk with highers levels of beta-casein on a Kappa-casein. Nature Biotecnhology 21, 157-162

Bronson, SK et alii (1996). Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. PNAS (U.S.A.) 93, 9067-9072

Buchanan, J.T. et alii (2001). Transfection of eaestern oyster (Crassotrea virginica) embryos. Marine Biotecnhology 3, 322-325

Campbell, K.H.S. et alii (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380, 64-66

Capecchi, M.R. (1989) – Altering the genome by homologous recombination. Science 244, 1288-1292

Chan, AWS, et alii (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in óocytes. PNAS (U.S.A.), 95, 14028-14033

Chan, AWS, et alii (1999) Timing of DNA integration, Transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. Molecular Reproduction and Development 52, 406-413

Clark, A.J. et alii (1989). Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. Biotecnhology 7: 487-492

Clark, J. (2000). Gene targeting in livestock: a preview http://www.roslin.ac.uk/publications/9900 annrep/targeting.html. Transgenic Research 9, 263-275

Clements, J.E. et alii (1994). Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. Virology 200, 370-80

Coll, J.M. (2000). Fish Biofactory Network (http://www.inia.es/redes/peces/IndexBiopez.htm

Collas, P. et alii (1999). The A-Kinase anchoring protein,AKAP 95 is a multivalent protein with a Key role in chromatin condensation at mitosis. J. Cell Biol, 147; 1167-1180

Crittenden, L B, Salter DW (1992). A transgene, alv 6, that express the envelop of subgroup A avian Leukosis virus reduces the rate of congenital transmission of a field strain of avian leukosis virus. Poultry Science 71, 799-806

Cyranoski, D. (2003). Koreans rustle madness resistant cows, Nature. 426,743

Damak, S. et alii (1996). Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor. Biotecnhology (New York) 14, 185-8

Denning, C. et alii (2001a).Delection of the _ (1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. Nat. Biotecnhol. 19, 559-562

Denning, C. et Priddle, H. (2003). New frontiers in gene targeting and cloning: sucess, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells- Reproduction. 126, 1-11

Denning, C et alli (2001). Gene Targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. Cloning and Stem Cells 3, 221-223

Descusa, P.A et alii (2001). Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placenta. Biology of Reproduction 65, 23-30

D'Costa, S, et alii (2001). Comparative development of avian Primordial Germ Cells and production of Germ Line Chimeras. Avian and Poultry Biology Reviews 12(4)- 151-188

Ebert, K.M. et alii (1991). Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. Biotecnhology 9: 835-840

Fan, W., et alii (2002). adenoviral- mediated transfer of a lysosphin gene in to the goat mammary gland. Journal of Dairy Science 85, 1709-16

FAO/WHO Expert consultation on the safety assessment of foods derived from genetically modified animals, including fish, Rome, 17-21 November 2003 Report

Fletcher, G. et alii (2002). Transgenic salmon for culture and consumption. In "International Congress on the Biology of Fish"(Eds.W.Driedzic, S Mckinley and D. Mackinley). p. 14. (University of British Columbia : Vancouver, Canada).

Golovan, S. P et alii (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. Nature Biotecnology 19. 741-1

Gordan, J.W.et Ruddle, F.H (1981). Integration and stable germ line transmission of gene injected in to mause pronuclei. Science 214, 1244-1246

Gurdon, J. B. et alii (1979). Reprogramming of transplanted nuclei in amphibia. International Reviews of Citology Supplement 9, 161-178

Håkelien, A. M. et alii. (2002). Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. Nature Biotecnhology 20, 5, 460-466

Hammer, R. E et alii (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature, 315, 680-683

Hammond, S.M et alii (2001). Post transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Reviews Genetics, 2, 110-119

Harper, G.S. et alii (2003). Global Progress toward transgenic food animals: a survey of publicaly available information. Transgenic Livestock Review CSIRO.
CSIRO Livestock Industries, 306 Carmody Rd., St. Lucia, Qld 4067

Harvey, A. J. et Ivarie, R. (2003). Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous protein in egg white Poultry Science 82, 927-930

Harrison, S. J. et alii (2002). Efficient generation of alpha (1,3) galactosyltransferase knockout porcine fetal fibroblasts for nuclear transfer. Transgenic Research 11, 143-150

Hew, C.L. et alii (1992). Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. Mol. Mar. Biol. Biotechnol.1:309-317

Houdebine, L.M. (2003). Trangenesis to improve animal production. Livestock Production Science 74, 255-268

Ivarie, R., (2003).Avian trangenesis: progress towards the promise. Trends Biotechnol 21(1): 14-9

Iyengar, A. et alii (1998). Refulation and expression of transgenes in fish – a review. Transgenic Research 5, 147-166

James, J.et Robbins, J. (1997). Molecular remodeling of cardiac contractile function. Am. J. Physiol 273 (Hearth Circ. Physiol. 42): H2105-H2118

Kadokawa, H. et alii (2003). Relationship between plasma concentrations of leptin and other metabolic hormones in GH. Trangenic sheep infused withe glucose. Domestic Animal Endocrinology 24, 219-29

Kasinathon, R.J.M. et alii (2003). Artificial chromosome vectors and expression of complex protein in transgenic animals. Theriogenology, 59(1) : 10713

Kerr, D.E. et alii (1998). The blader as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone in to urine. Nature Biotechnology 16, 75-9

Kerr, D.E et alii (2001). Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in trangenic mice. Nature Biotechnology 19, 66-70

Kikyo, N. et alii (2000). Active remodeling of somatic nuclai in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. Science 289, 2360-2362

Kuroiwa, Y et alii (2004). Sequential targeting of the genes encoding immunoglobuline-_ and prion protein in cattle. Nature Genetics 36, 7, 775-780

Lai, L. et alii (2002). Production of _ 1-3 galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science 295, 1089-1092

Lin, S. (2000). Transgenic zebrafish. Methods Mol. Biol.136; 375-383

Lyon RE, Li Y (2002). Crustacean genomics implications for the future in aquaculture. Ag BiotechNet 4, 1-6

Maga, EA e Murray, J. D. (1995). Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk Bio-Technology (New York) 13, 1452-7

Mattioli, R.C., et alii (2000). Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypano tolerant N'Dama (Bos taurus and trypanosusceptible Gobra zebu (Bos indicus). Acta Tropica 75, 263-77

Mc Creath, K.J. et alii (2000). Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature 405, 1066-1069

Mc Farland, GA et Holliday, R (1999). Further evidense for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. Experimental Gerontology 34, 35-45

Mozdziak, P.E. et Petite, J. N. (2004). Status of transgenic chiken models for development biology. Developmental Dynamics 229:414-421

Murray, James D.UC Davis (1999). http://www.cdrf.org/research/butter 1999. htm

Naito, M. et alii (1998). Expression of exogenous DNA in gonads of chimaeric chicken embryos produced by transfer of primordial germ cell transfected in vitro and subsequent fate of the introduced DNA. J. Reprod. Ferti.113(1), 137-43

Paul, C.P. et alii (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nature Biotechnology 20, 5, 505-508

Perrier, V.et alii (2002). Dominant-negative inhibition of prion replication in trangenic mice. PNAS (USA) 99, 13079-13084

Perry, A.C. et alii (2001). Efficient metaphase II transgenesic with different transgene archetypes. Nat. Biotechnol. 19(11), 1071-3

Petity, N., et alii (2004). Avian pluripotent stem cells. Mechanism of Development. 121, 1159-1168

Phelps, C.J. et alii (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase- deficient pigs. Science 299, 411-414

Pirottin, D. et alii (2005). Transgenic engineering of male-specific muscular hypertrophy- PNAS, 102, 18, 6413-6418

Polejaeva, I.A. et alii (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult soma. Nature 407, 86-90

Powell, B.C. et alii (1994). Transgenic sheep and growth: Possibilities and current states. Reproduction Fertility and Development 6, 615-23

Primrose, S.B., Twyman, R.M. et Old, R.W. (2001) Principles of Gene Manipulation – 6 Ed. Blackwell Science

Ramsoordar, J.J. et alii (2003). Production of {alpha} 1,3- galactosyltransferase knockout cloned pigs expressing human {alpha} 1,2 – fucosyltransferase. Biology of Reproduction

Rao, J. M. et alii (1994). Recombinant hemoglobin A produced in transgenic swine: structural equivalence with human hemoglobin A. Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology 22, 695-700

Rapp JC. et alii (2003). Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of trangenic hens. Transgenic Research 12 : 569-575

Reichhardt, T. (2000). Will souped up salmon sink or swin? Nature 406:10

Richt, J.A. et alii (2006). Production of cattle lacking prion protein. Nature Biotecnhology. Published on line, 31 December 2006; I doi:10,1038/nbt 1271

Rideout, WM 3rd et alii (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. Cell 109, 17-27

Robl, J.M, et alii (2003). Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals. Theriogenology 59,107-13

Rocha, A et alii (2004). Application of inducible and targeted gene strategies to produce transgenic fish: a review- Marine Biotechnology 6, 118-127

Rubin, H. (2002). The disparity between human cell senescence "in vitro" and lifelong replication "in vivo". Nature Biotechnology 20, 675-681

Rülicke, T. et Hübscher, V. (2000). Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. Experimental Physiology 85. 6, 589-601

Saif, L.J et Wheeler, M.B(1998) Wapping gastroenteritis with transgenic antibodies. Nature Biotechnology 16, 334-335

Saini, K.S. Et alii (1996). Introduction and expression of the bacteria glyoxylate cycle genes in transgenic mice. Transgenic Research 5, 467-473

Schnicke, A. E. et alii (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science 278, 2130-2133

Shiels, P.G. et alii, (1999). Analisis of telomere lenghts in cloned sheep. Nature 399, 316-317

Sif, S. et alii (1998). Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. Genes Dev. 12; 2842-2851

Sin Fyt, et alii (1993). Gene transfer in chinook salmon (Oncorhynchus-tshawytscha) by electroporating sperm in the presence of Prsv-laczDNA. Aquaculture 117, 57-59

Simons, J.P. et alii (1987). Alteration of the quality of milk by expression of sheep _-lactoglobulin in transgenic mice. Nature 328: 530-532

Steen, R.L. et alii (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-Kinase enchoring protein AKAP 149 is a prerequesite for nuclear lamina assembly. J.Cell Biol, 150: 1251-1262

Strachan, T. e Read, A. P. (1999). Human Molecular Genetics (-table 22.1.). Bios Scientific Publishers, Ltd, 1999

Su Hy, et alii (1998). Wool production in transgenic sheep: results from first-generation adults and second generation lambs. Animal Biotechnology 9, 135-47

Sullivan, E.J.et alii (2004). Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. Biology of Reproduction 70, 146-153

Templeton, N. S. et alii (1997). Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells. Gene Therapy 4, 700-709

Thermes, V. et alii (2002). I- SceImeganuclease mediates highly efficience transgenesis in fish. Mechanisms of Development 118, 91-8

Vilolte, J.L. et alii (1989). Efficient tissue-specific expression of bovine _ lactalbumine in transgenic mice. Eur. J.Biochem.186: 43-45

Wall, R.J.et alii (1992). Making transgenic livestock genetics engineering on a large scale. Journal of Cellular Biochemistry 49, 113-20

Wall, R.J. et alii (1991) High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic suine. PNAS 88:1696-1700

Wheeler, M.B, Walters, E.M. (2001). Transgenic technology and application in swine. Theriogenology 56, 1345-69

Wheeler, M.B. (2003) . Production of transgenic livestock: promise fulfilled. J.Anim. Sci. 81 (Supl 1.3): 32-37

Whitelaw, B (1999). Toward design milk. Nature Biotechnology 17, 135-6

Wianny, F, et Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat. Cell Biol-2:70-75

Wilmut, I et alii (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810-813

Wilmut, I et Peterson, L.A (2002). Somalic cell nuclear transfer (cloning) efficiency. Http://www.roslin.ac.uk/public/webtables GR.pdf

Wilmut, I et alii (2002). Somatic cell nuclear transfer. Nature 419, 583-587

Wilmut, I. -Development plasticity in mammals: implications for Biology and Medicine. Publications-Roslin Institute Edinburgh. http://www.roslin.ac.uk/publications/9900annrep/plasticity.html

Yifan, D.et alii (2002). Targer disruption of the _ 1;3 galactosyltransferase gene in cloned pigs. Nat. Biotechnol. 20, 251-255

Zhang, J. X et alii (1999). Expression and processing of a bacterial endoglucanase in transgenic mice. Archius of Biochemistry and Biophysics 367, 317-321

Zhang, Q -et Fan, T. (2000). Advances in fish anti freeze protein research. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Li Xue Bao (Shangai) 34: 124-130 (in Rocha, A, 2004)

Zhao, D. F, Kuwana, T. (2003). Purificationof avian circulating primordial germ cell by nycodenz density gradient centrifugation. Br.Poult Sci. 44(1): 30-5

Zhu, Z. et alii (1985). Novel gene transfer into the fertilised eggs of gold fish (Carassius auratus L. 1758). Journal of Applied Ichlthyology 1, 31-34