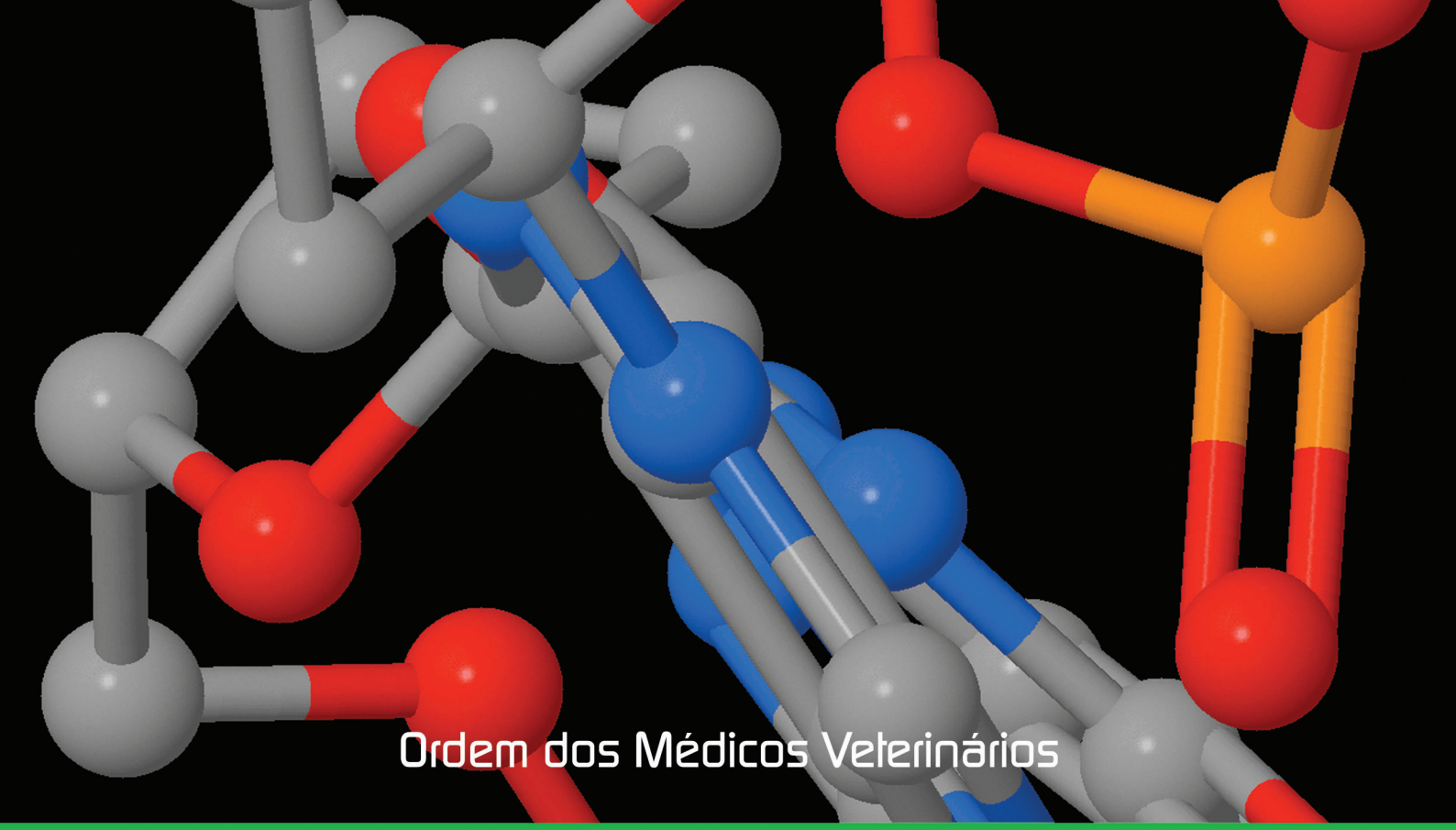


Introdução à Biotecnologia Animal Moderna

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**

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					Mais de 6 meses
COL1 A1	417	80(19,2%)	20(4,8%)	14(3,4%)	2(0,5%)
PrP	454	47(10,3%)	8(1,8%)	3(0,7%)	0(0%)
GGTAI	265	55(20,7%)	7(2,6%)	0(0%)	0(0%)
Suínos					sobreviventes
GGTA1	3104	28(0,9%)	9(0,3%)	7(0,2%)	4(0,1%)
GGTA1	2513	11(0,4%)	__	5(0,2%)	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).

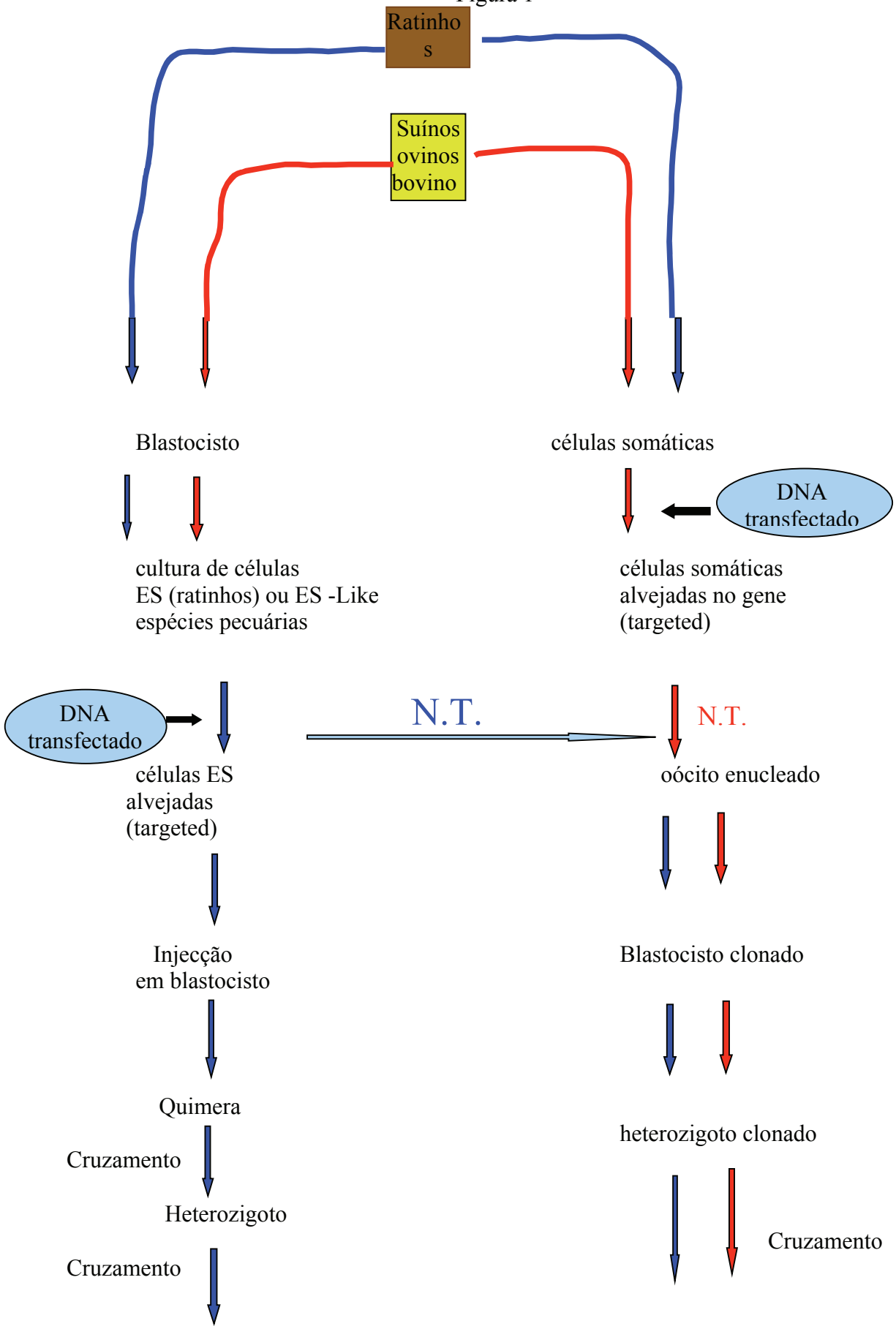
Também vírus recombinantes, adeno associados, para a inserção de transgenes funcionais em outros genes,têm sido reportados como tendo uma alta eficiência (até 1% das células em culturas), embora com a limitação de 4kb no tamanho da sequência nucleotidica inseridos.

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.

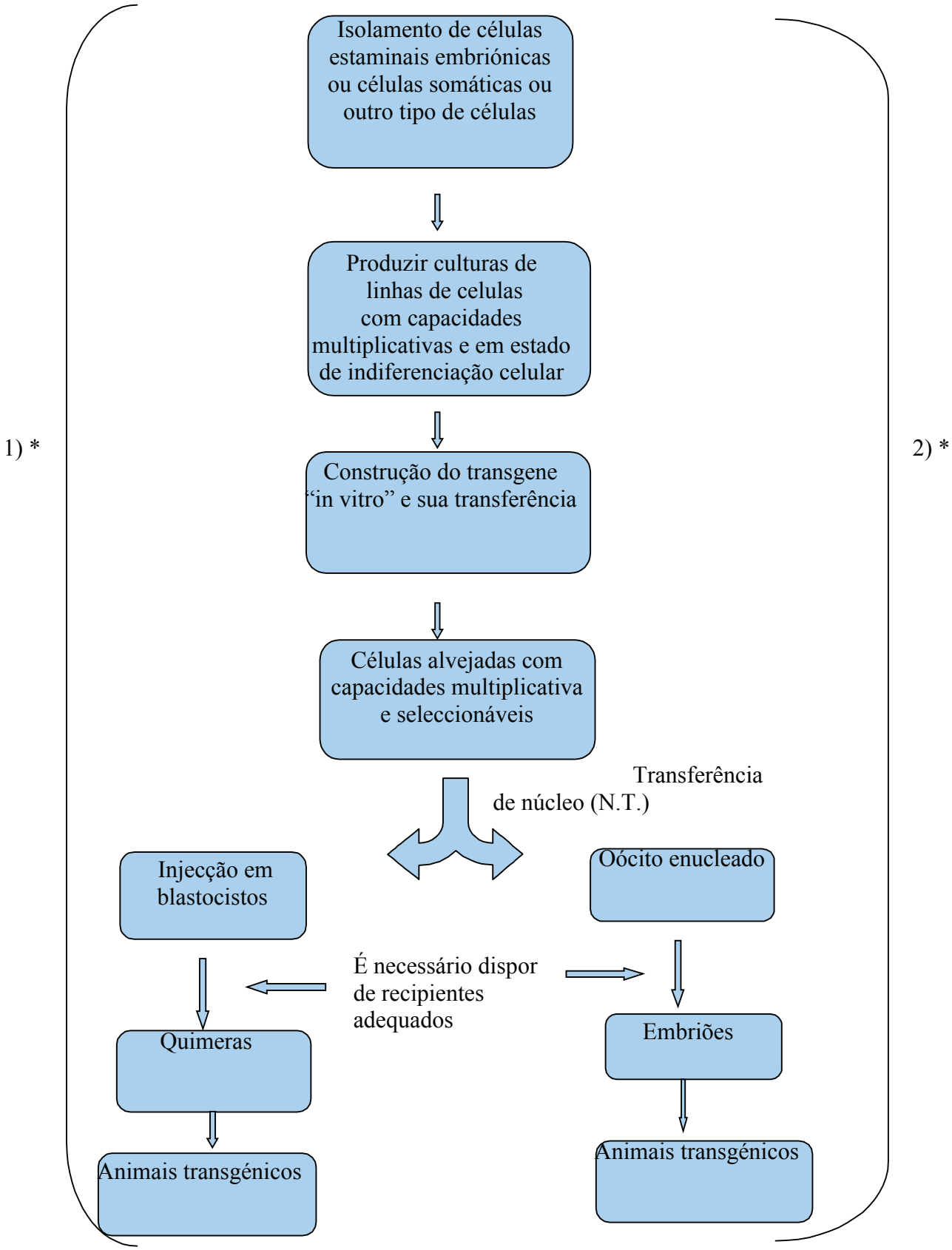
Por essas razões é muito mais difícil operar a transgénese nos animais do que a sua simples clonagem, até porque a clonagem pode ser uma das diversas etapas envolvidas na transgénese que envolve por outro lado a construção "in vitro" do transgene e a sua incorporação em veículos adequados que possam 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).

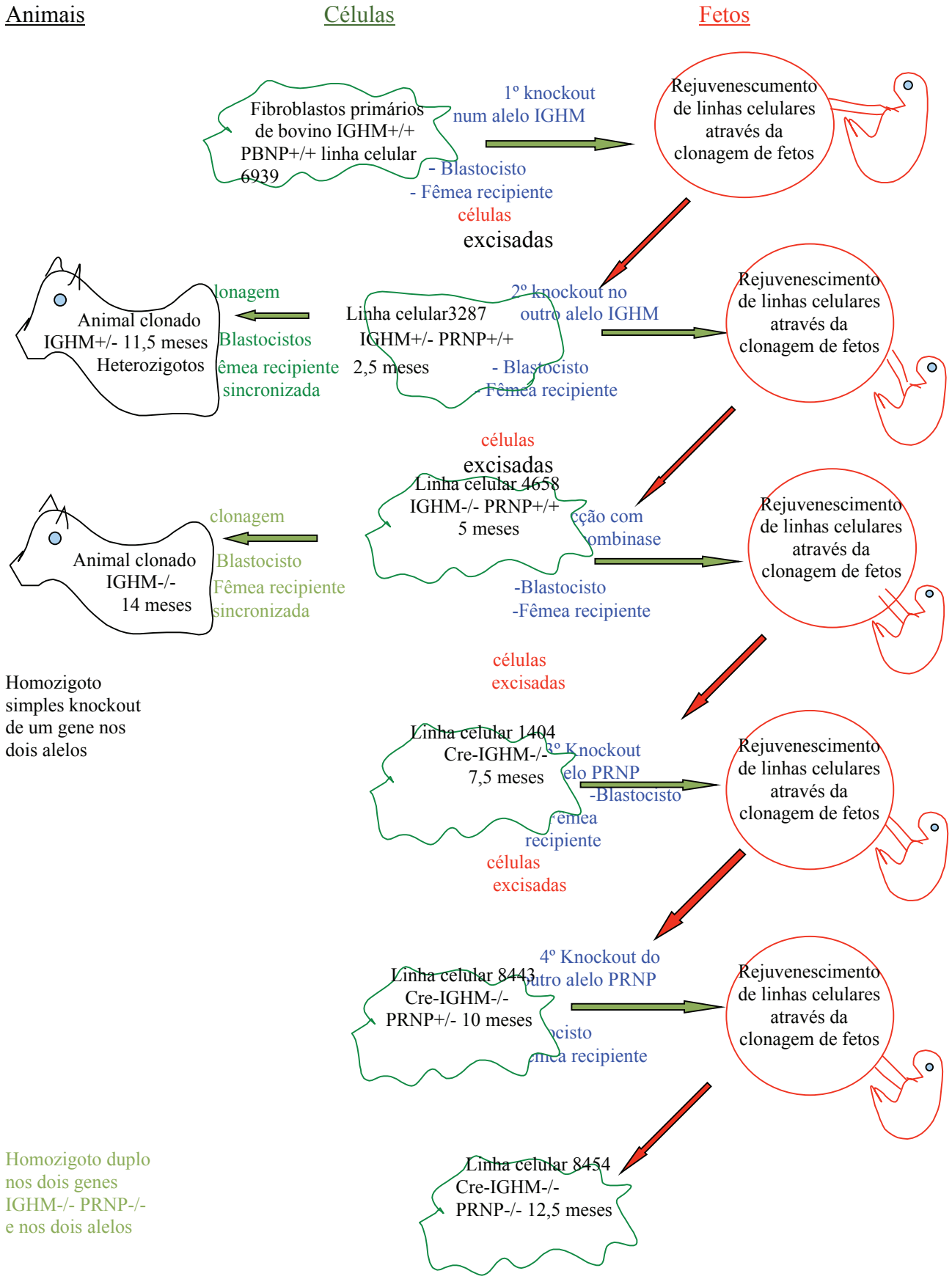
Conseguiram assim alvejar (targeting) um gene silencioso (não transcrito) e produzir vitelos heterozigotos e homozigotos para esse gene IGHM, tendo também modificado um segundo gene, o PRNP, produzindo bovinos e linhas celulares duplamente knockout e duplamente homozigóticas para dois genes diferentes.

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.

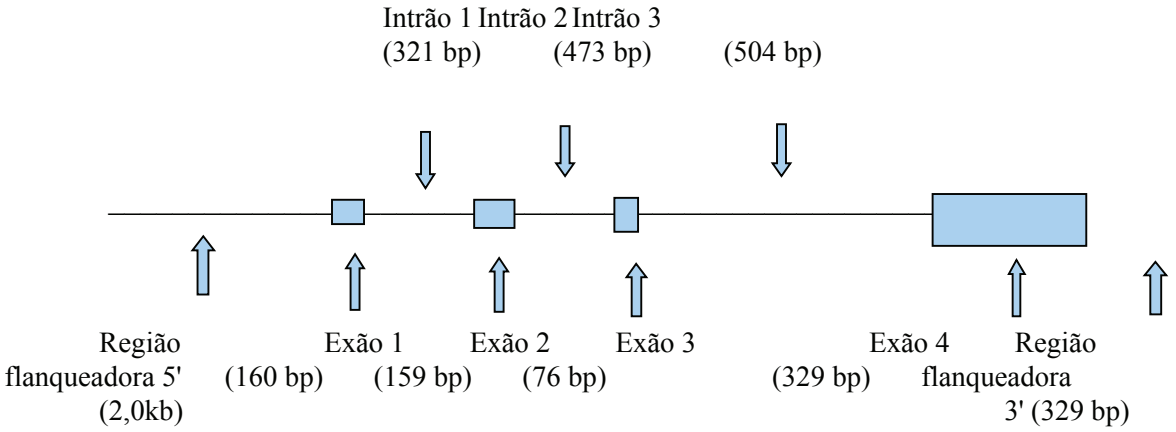
10.2.1.1 – Transgénese de _ -lactalbumina bovina em suínos (Bleck, G.T., et alii, 1998)

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.

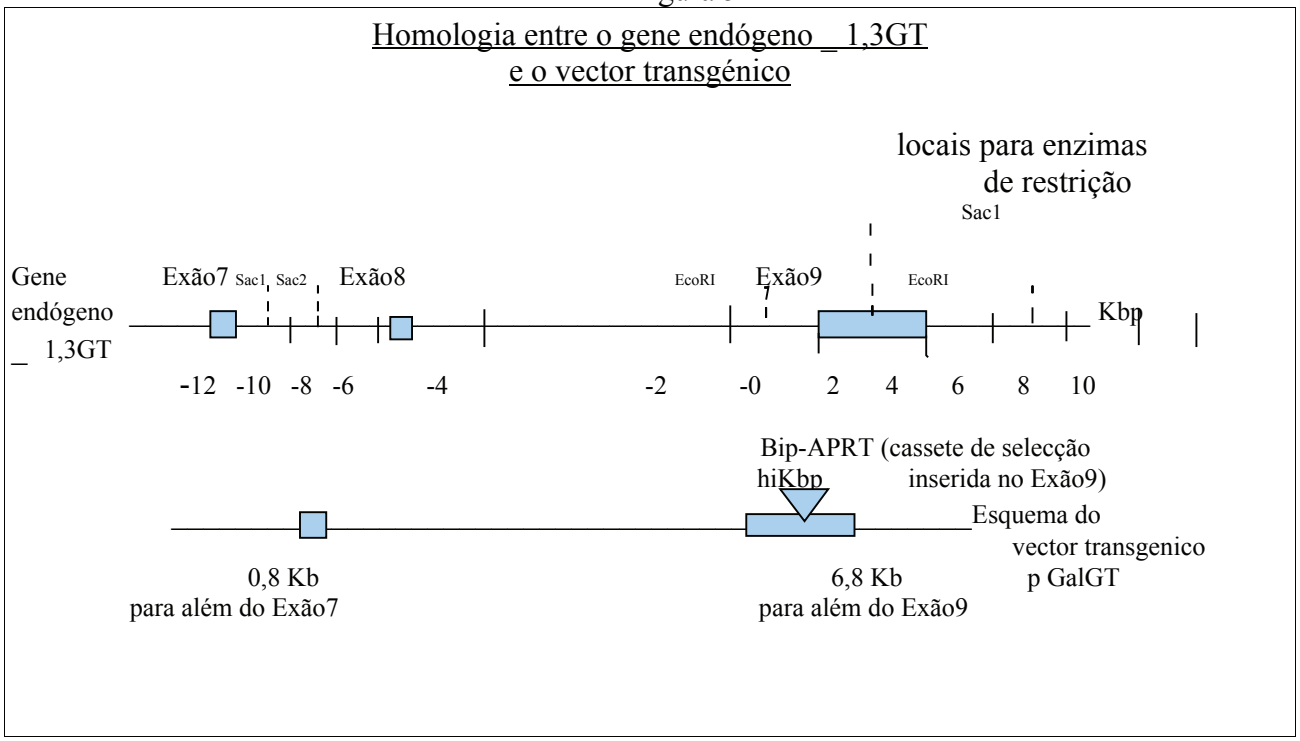
As células criopreservadas para a transferência de núcleos contendo o transgene, eram descongeladas a 37ºc, com a adicção do soro bovino fetal e esta suspensão mantida à temperatura ambiente 30 minutos, sendo depois utilizados para o transplante de núcleos.

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 – 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).

11.

10.3.3 – 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)

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