

Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico

Production of transgenic animals by nuclear transfer: model for biological studies

Fabiana Fernandes Bressan¹, Moyses dos Santos Miranda², Tiago Henrique Camara De Bem, Flávia Thomaz Verechia Pereira³, Mario Binelli¹, Flavio Vieira Meirelles²

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal.

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Básicas.

³Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Zootecnia, Campus de Dracena.

Correspondência: meirelff@usp.br

Resumo

O recente progresso na clonagem animal por transferência nuclear (TN) possibilitou a produção de animais transgênicos utilizando linhagens de células doadoras de núcleo modificadas geneticamente. A possibilidade de manipulação genética, o estudo da expressão gênica e a adequada seleção da célula doadora de núcleo não somente podem garantir a presença da construção gênica em toda a prole, como também podem evitar a produção de animais portadores de modificações indesejáveis resultantes da inserção aleatória do inserto em regiões codificantes do genoma. Esta revisão tem como objetivo discutir a utilização da transferência nuclear de célula somática (TNCS) como método de escolha para a transgenia animal.

Palavras-chave: transgenia, transferência nuclear, bovino.

Abstract

Recent progress in animal cloning by nuclear transfer (NT) has made possible the production of transgenic animals using previously genetically modified cell lineages. The possibility of genetic manipulation, gene expression studies and adequate selection of the nuclei donor cell for NT not only can guarantee the presence of the gene construction in the offspring, but also can avoid the production of animals that carries undesirable characteristics, often as a result of the random insertion of transgenes in transcribed areas of the genome. This review aims to discuss the use of somatic cell nuclear transfer (SCNT) in animal transgenesis.

Keywords: transgenesis, nuclear transfer, bovine.

Introdução

A tecnologia transgênica ocupa um papel de destaque nos avanços da biotecnologia. A possibilidade de manipulação genética *in vitro* de organismos revolucionou o entendimento sobre processos biológicos e moleculares, abrindo uma grande oportunidade de praticar a ciência de um modo antes não imaginável. A adição ou a inativação de genes de interesse em plantas ou em animais resulta em inúmeras aplicações na biomedicina, na biologia molecular e na agropecuária. Via de regra, as aplicações, como a produção de produtos farmacológicos, a produção de modelos para estudos de doenças animais ou humanas, a melhoria de características de produção animal, o estudo da regulação e a expressão gênica, entre muitas outras, são direta ou indiretamente relacionadas ao bem-estar do homem (Jaenisch, 1988; Houdebine, 2005b).

Os primeiros sucessos na tecnologia de transferência de genes em modelos animais datam do começo da década de 80. Brinster *et al.*, (1980), após microinjeção intracitoplasmática, observaram que o zigoto murino traduziu tanto o RNA mensageiro de globina de coelho quanto de camundongo. Gordon e Ruddle, em 1981, desenvolvendo a técnica de microinjeção pronuclear em zigotos, introduziram o termo "transgênico" pela primeira vez, produzindo camundongos geneticamente modificados pela introdução de DNA exógeno em embriões em fases iniciais do desenvolvimento. Atualmente, o termo transgenia é considerado como a introdução, alteração ou inativação de uma sequência gênica no genoma de organismos pluricelulares, mudanças estas capazes de serem transmitidas à progênie da espécie manipulada (Rulicke *et al.*, 2007).

Outro importante marco na transgênese animal foi a introdução do gene do hormônio de crescimento de rato e do promotor da metalotioneína do camundongo em zigotos de rato, através da microinjeção, em 1982 (Palmiter *et al.*, 1982), quando, pela primeira vez, provou-se que o animal transgênico pode produzir grandes quantidades de determinada proteína e, assim, tornar-se um biorreator. A partir de então, muitas outras tecnologias foram desenvolvidas para a transferência de genes de interesse em animais. A primeira espécie

animal de produção transgênica foi produzida somente alguns anos após, em 1985, também via microinjeção de DNA exógeno em pronúcleos de zigotos ovinos e suínos, além de coelhos (Hammer *et al.*, 1985).

Muitos são os métodos utilizados na manipulação genética de organismos: microinjeção pronuclear de DNA exógeno em zigotos (Gordon e Ruddle, 1981; Hammer *et al.*, 1985), transferência de DNA mediada por espermatozoide durante a fertilização *in vitro* (Lavritano *et al.*, 1989), transferência de DNA para células ou embriões mediada por lipossomos, eletroporação de DNA em espermatozoides, zigotos ou embriões, injeção de células embrionárias previamente modificadas em blastocelos e a transferência nuclear de células somáticas ou embrionárias também previamente geneticamente modificadas (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998; Wheeler 2003). O principal fator limitante de todas as técnicas é a baixa eficiência, tornando-as caras e laboriosas. A microinjeção, por exemplo, a mais comum das metodologias, produz aproximadamente 2% de camundongos transgênicos (Palmiter *et al.*, 1982), 1% em suínos (Nagashima *et al.*, 2003) e um número ainda menor de caprinos, ovinos e bovinos (Baldassarre *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2000).

Tais técnicas também já demonstraram que a inserção do transgene no genoma hospedeiro é predominantemente aleatória (Clark *et al.*, 2000), o que torna a expressão transgênica, quando presente, de regulação imprevisível. Tal fato é importante porque a expressão de um transgene é influenciada pela sua localização no DNA genômico, ou seja, seu posicionamento em relação a elementos de controle transcricional, regiões de heterocromatinas não-transcritas dos cromossomos, além de outras regiões silenciadas. Também, como desvantagem da inserção aleatória, a integração pode causar um efeito *knock-out* não intencionado (Rulicke e Hubscher, 2000; Williams *et al.*, 2008). A área de DNA genômico próxima à região de integração do inserto pode ter, frequentemente, sua expressão alterada, uma vez que podem ocorrer várias formas de duplicação, deleção ou rearranjo da sequência como consequência da incorporação do transgene. As mudanças fenotípicas resultantes podem ser cruciais para o bem-estar animal ou mesmo para a criação e manutenção de linhagens transgênicas (Rulicke e Hubscher, 2000; Dunn *et al.*, 2005).

Um exemplo deste fenômeno foi relatado por Punzon *et al.* (2004), que detectaram que a variabilidade da secreção do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, *GM-CSF*) em camundongos transgênicos era independente do número de cópias e poderia ter sido resultante de um efeito de posição do inserto, levando à ativação de mecanismos de silenciamento. O mesmo efeito também foi achado por Hofmann *et al.* (2006), que encontraram que o sítio de integração do transgene pode severamente afetar a expressão do gene codificador da Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP), um conhecido gene repórter.

Muitos estudos ainda são necessários para o entendimento e o relacionamento entre o padrão e o nível de expressão de uma construção introduzida em uma determinada célula e sua localização cromossomal. Felizmente, metodologias vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar o entendimento e sucesso nesta área (Houdebine, 2002). A técnica de transferência nuclear (TN), aliada à eficiente modificação genética da célula doadora de núcleo, apresenta vantagens importantes quando comparada a outras técnicas, incluindo a bem caracterizada injeção pronuclear (Clark *et al.*, 2000; Keefer *et al.*, 2001; Bordignon *et al.*, 2003).

Esta revisão tem como objetivo apresentar opções metodológicas para a produção de animais geneticamente modificados, que permitem superar os desafios e aumentar os índices de sucesso da técnica. Discute-se, em particular, a viabilidade da utilização da transferência nuclear de célula somática (TNCS) como método de escolha para o procedimento. Serão abordados os conceitos de transferência nuclear, a tecnologia de transferência de genes, a seleção da célula doadora de núcleo para a transferência nuclear e a aplicabilidade de animais transgênicos produzidos por transferência nuclear.

Transferência nuclear

A técnica de transferência nuclear permite a produção de animais contendo genomas idênticos. Para tal, o material genético nuclear de uma célula do animal que se deseja clonar é introduzido em um oócito previamente enucleado, chamado de citoplasto. Este conjunto célula-citoplasto é submetido a pulsos elétricos, que promovem a fusão das membranas, seguidos de uma ativação artificial quimicamente semelhante àquela desencadeada pelo espermatozoide em uma fecundação normal. Havendo sucesso, o núcleo celular será reprogramado e dará início ao desenvolvimento embrionário. Cada embrião assim reconstruído será geneticamente idêntico ao animal que deu origem às células doadoras de núcleo (Wakayama *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2000).

A transferência nuclear utilizando células modificadas geneticamente como doadoras de núcleo permitiu grandes avanços técnicos na produção de animais transgênicos. O DNA exógeno, quando incorporado no genoma celular, pode ter sua inserção e expressão verificadas antes da utilização destas células na produção animal (Roh *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005b).

Os primeiros experimentos de transferência nuclear em mamíferos, tanto de laboratório quanto de produção, foram realizados utilizando-se células embrionárias não modificadas como células doadoras de núcleo. Respectivamente, Illmensee e Hoppe (1981), em camundongos, e Willadsen (1986), em ovinos, assim como outros grupos de pesquisa da época, acreditavam na pluripotencialidade das células embrionárias para o sucesso da reprogramação nuclear e desenvolvimento dos demais tipos celulares de um organismo (McGrath e Solter, 1983; Seidel, 1983; Prather *et al.*, 1987).

Células-tronco embrionárias são linhagens obtidas de embriões nos estágios iniciais de mórula ou blastocisto. Tais células são capazes de participar da formação de todos os tecidos, incluindo gametas. O DNA exógeno pode ser incorporado nestas células, que, após seleção, são introduzidas em oócitos enucleados ou mesmo em embriões em estágio pré-implantacional. Quando introduzidas em embriões, uma determinada proporção das células-tronco torna-se parte desse embrião. Uma vez que os embriões são transferidos para fêmeas receptoras, os indivíduos originados podem se tornar quimeras, ou seja, portadores de células geneticamente modificadas em somente alguns de seus tecidos (Bradley *et al.*, 1984; Voss *et al.*, 1997).

Em camundongos, células-tronco embrionárias são uma boa alternativa a outras técnicas de produção de animais geneticamente modificados, pois não só permitem a correta modificação genética por meio de seleção, mas também possibilitam desde que as células germinativas contêm o transgene, que o DNA exógeno possa ser transmitido para a progênie por herança mendeliana por reprodução sexuada. Porém, células-tronco embrionárias pluripotentes ainda não foram completamente caracterizadas em animais de produção (Munõz *et al.*, 2008). A utilização de células “semelhantes às células-tronco” (*stem cell-like*), que são células epitelioides que se assemelham aos cultivos de célula-tronco e que guardam certa pluripotência, não permitiu até o momento a transmissão da modificação genética à prole (Wheeler, 1994; Notarianni *et al.*, 1997; Schnieke *et al.*, 1997). De fato, esta é a principal limitação da utilização de células-tronco embrionárias na produção de animais de produção transgênicos.

A utilização de células somáticas na produção de animais transgênicos oferece grande flexibilidade aos pesquisadores. Células somáticas, tanto de animais de produção, de laboratório, ou mesmo de animais silvestres e de companhia, são facilmente manipuladas e cultivadas *in vitro*, provendo um amplo estoque de material genético desejado. Utilizando-se a clonagem de células somáticas, a produção de ovelhas transgênicas foi 2,5 vezes mais eficiente do que se usando microinjeção (Houdebine, 2000). Esse método também permite que pesquisadores estudem o transgene integrado e mantenham as células somáticas geneticamente modificadas congeladas até a clonagem.

Wilmot *et al.* (1997) reportaram o nascimento da ovelha *Dolly*, o primeiro mamífero clonado a partir de células somáticas adultas cultivadas em laboratório. Este estudo, na verdade, teve como objetivo principal o estabelecimento de uma metodologia eficaz para a produção de animais de produção transgênicos, e de fato essa técnica foi logo implementada para obtenção de ovelhas transgênicas. Mais recentemente, uma variedade de células somáticas geneticamente modificadas permitiu a produção de animais transgênicos após transferência nuclear: fibroblastos fetais (Campbell *et al.*, 1996), células do *cumulus* (Wakayama *et al.*, 1998), células musculares (Shiga e Oppenheim, 1999) e células epiteliais mamárias (Zakhartchenko *et al.*, 1999), entre muitas outras.

Logo após o nascimento da ovelha *Dolly* (Wilmot *et al.*, 1997), a transferência nuclear de célula somática foi utilizada sem grandes modificações e com sucesso na produção de várias espécies de animais de produção transgênicos (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998), promovendo um aumento substancial na proporção de animais vivos transgênicos (Polejaeva e Campbell, 2000; Kuroiwa *et al.*, 2002).

As etapas do procedimento de transferência nuclear estão sumarizadas na Fig. 1. O cultivo e a seleção de células doadoras de núcleo são particularmente importantes para o sucesso da técnica, como será discutido nesta revisão. Oócitos são obtidos por aspiração de ovários, provenientes de abatedouros ou de fêmeas selecionadas. Oócitos são maturados *in vitro* e selecionados quanto à extrusão do 1º corpúsculo polar para a confirmação da maturação. A enucleação destes oócitos é feita pela retirada do material genético por aspiração com micropipetas. A introdução da célula geneticamente modificada no espaço perivitelínico do oócito também é realizada pelo sistema de micromanipulação. Os complexos célula-ooplasto são submetidos a pulsos elétricos, para que ocorra a fusão das membranas celulares, e posteriormente à ativação química dos conjuntos. Havendo sucesso em todas as etapas, o material genético da célula será reprogramado e o desenvolvimento embrionário será iniciado. O cultivo *in vitro* destes embriões é realizado por sete dias, quando, então, os embriões que alcançaram o estágio de blastocisto são transferidos para fêmeas receptoras para estabelecimento da prenhez, ou podem ser direcionados a estudos específicos.

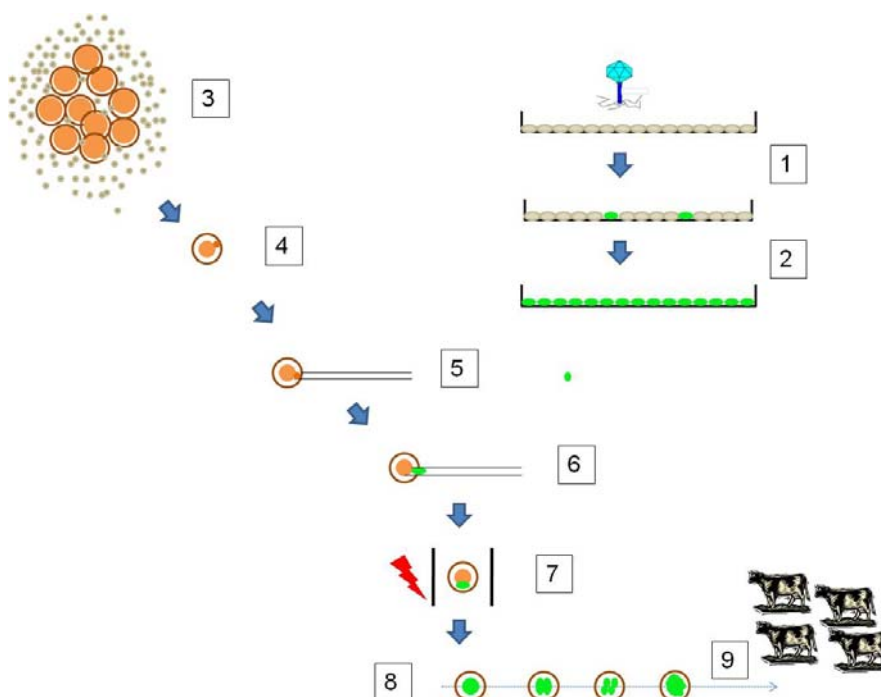


Figura 1: Esquema representativo das etapas da transferência nuclear utilizando células somáticas transgênicas como doadoras de núcleo. (1) transdução lentiviral. (2) seleção das células que expressam o transgene. (3) Maturação *in vitro* de oócitos. (4) Seleção dos oócitos que extruíram o 1º corpúsculo polar. (5) Enucleação do oócito: retirada da placa metafásica. (6) Introdução de uma célula transgênica no espaço perivitelínico do citoplasto receptor. (7) Eletrofusão das membranas. (8) Ativação química dos complexos. (9) Cultivo *in vitro* dos embriões e inóculo em fêmeas receptoras

Técnica de transferência de genes

Uma das grandes vantagens da técnica de transferência nuclear na produção de animais transgênicos, e talvez a mais importante, é a possibilidade da manipulação genética das células que servirão como doadoras de núcleo, produzindo animais geneticamente idênticos à célula selecionada. A modificação genética destas células pode ser obtida aplicando-se diversas metodologias, sendo as mais comuns a transfecção de DNA exógeno por lipossomas, por eletroporação e a transdução por vetores virais (Li, 2004; Hendrie e Russell, 2005; Karmali e Chaudhri, 2007).

Lipossomas consistem em camadas de lipídeos semelhantes a lipídeos de membrana. São compostos catiônicos capazes de interagir espontaneamente com moléculas de DNA, formando complexos lipídeo-DNA. A introdução do DNA nas células ocorre pela fusão do complexo lipídeo-DNA com as membranas celulares. A técnica é simples, porém os resultados são bastante variáveis. Dependendo de diversos fatores, obtém-se de zero a aproximadamente 50% das células expressando o transgene (Oliveira *et al.*, 2005), entretanto a maior parte desta expressão é transiente, ou seja, o DNA transcrito não é integrado no material genético celular. Para que ocorra esta integração, é necessário que, em condições propícias, parte deste DNA chegue espontaneamente ao núcleo (Zuckerbraun e Tzeng, 2002). Uma série de fatores prejudica a eficiência da técnica, como o tamanho e carga elétrica do DNA exógeno e diversas barreiras enzimáticas e de membranas, resultando na baixa eficiência da técnica (Felgner *et al.*, 1987; Melo *et al.*, 2005).

Na eletroporação, o DNA de interesse é incubado em solução com as células-alvo. A solução é submetida a um pulso elétrico de curta duração e alta voltagem, o que provoca desestabilização e a abertura de poros nas membranas celulares, permitindo a entrada do DNA. Como na lipofecção, o DNA precisa atingir o núcleo para que haja a possibilidade de integração estável ao genoma. Desta maneira, assim como na lipofecção e em outras técnicas não virais de transferência gênica, as maiores desvantagens são a baixa eficiência de transfecção e a natureza transiente de expressão do transgene (Romano, 2007).

Avanços recentes nos sistemas retrovirais de tecnologia de transferência gênica possibilitaram a perspectiva da terapia gênica e do estabelecimento de modelos transgênicos animais (Yang *et al.*, 2007). Os

lentivírus pertencem à vasta família dos retrovírus, que possuem uma alta capacidade intrínseca de integração ao genoma. Os retrovírus são considerados veículos naturais de transferência de material genético ao genoma de células de mamíferos (Linney *et al.*, 1999; Houdebine, 2002). Por meio de uma inserção aleatória da construção de interesse no genoma hospedeiro, os retrovírus possuem o potencial de promover uma transdução eficiente, estável e duradoura em uma grande variedade de tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (Gropp *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2003). Além disso, em relação aos outros vírus componentes da família dos retrovírus, os lentivírus apresentam vantagens. Podem inserir genes específicos em cromossomos de células-alvo em divisão ou não, pois seu complexo pré-integração é transportado ativamente para dentro do núcleo (Naldini *et al.*, 1996; Follenzi *et al.*, 2000). Finalmente, o “silenciamento” de genes inseridos ainda não foi observado quando lentivírus foram utilizados na transgênese (Lois *et al.*, 2002; Gropp *et al.*, 2003; Ikawa *et al.*, 2003). Além disso, a utilização de um sistema de transdução em células *in vitro* torna possível a avaliação da natureza de promotores tecido-específicos antes da aplicação destes em estratégias de terapia gênica (Lois *et al.*, 2002).

Diversos animais transgênicos já foram produzidos utilizando-se o sistema lentiviral, como, por exemplo, ratos (Michalkiewicks *et al.*, 2007), camundongos (Lois *et al.*, 2002), bovinos (Hofmann *et al.*, 2004), suínos (Hofmann *et al.*, 2003) e aves (McGrew *et al.*, 2004). Em particular, o sistema lentiviral é especialmente interessante para a transgenia de animais de produção, por não apresentar algumas desvantagens reportadas em outras técnicas, como, por exemplo, a microinjeção pronuclear (Hofmann *et al.*, 2003).

Seleção da célula doadora de núcleo para a transferência nuclear de célula somática

Grande parte do sucesso tanto da clonagem quanto da transgenia se deve à etapa de cultivo e seleção da célula doadora de núcleo. Campbell *et al.* (2007) sugeriram que a indução da célula doadora de núcleo, ao sair da fase de crescimento, causa mudanças na estrutura de sua cromatina que facilita a reprogramação da expressão gênica. A fase G0 do ciclo celular, portanto, é ideal para a clonagem, pelo fato de a estrutura da cromatina ser propícia e a célula ser diploide. Tal indução pode ser realizada rotineiramente em laboratório pela privação de soro no cultivo celular ou pela confluência celular (Campbell *et al.* 1996; Wilmut *et al.*, 1997).

As principais vantagens da transferência nuclear de célula somática são decorrentes da possibilidade do cultivo *in vitro* de células doadoras de núcleo. Essa característica permite a quantificação, o posicionamento genômico e a confirmação da expressão do transgene (Lisaukas *et al.*, 2007), possibilitando o estabelecimento de linhagens de interesse, eventualmente levando ao nascimento de proles exclusivamente portadoras da modificação genética (Cibelli *et al.*, 1998; Bordonon *et al.*, 2003; Hyun *et al.*, 2003).

Neste contexto, a utilização de genes repórteres torna-se imprescindível no processo de produção de animais transgênicos, por permitir a seleção das células que expressam a inserção gênica.

Genes de resistência a antibióticos como neomicina, ampicilina e puromicina, como exemplos, são geralmente usados como genes repórteres por permitirem a seleção celular em cultivo (Park, 2007). Com a adição de concentrações elevadas do antibiótico específico no cultivo, espera-se que somente as células que receberam o transgene contendo o gene de resistência ao antibiótico sejam capazes de manter a viabilidade durante diversas passagens (Eglitis, 1991).

O processo de introdução de DNA exógeno e seleção celular por antibióticos demanda, além do tratamento com alta concentração de antibióticos, um período de cultivo prolongado para a seleção. Tal procedimento pode ser prejudicial à capacidade da célula em cultivo de completar a mitose, aumentando a frequência de células apresentando condensação da cromatina e organização anormal do fuso mitótico (Collas *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1998). Essas alterações dificultam o desenvolvimento de protocolos de sincronização do ciclo celular utilizados na transferência nuclear de célula somática, causando alterações na ploidia e no posterior desenvolvimento embrionário (Campbell *et al.*, 1996; Bordonon *et al.*, 2003).

Alternativas à utilização de genes de resistência a antibióticos foram mais recentemente desenvolvidas. O uso de genes que codificam proteínas fluorescentes é uma alternativa que diminui o tempo das células em cultivo em comparação à utilização dos genes de resistência a antibióticos. Marcadores fluorescentes podem ser utilizados em diversos protocolos que visam ao estudo dos processos iniciais de desenvolvimento embrionário, da ativação genômica e da reprogramação epigenética. Quando fusionados a genes codificantes de proteínas funcionais, servem para o estudo de sua localização intracelular em células, tecidos e organismos vivos. Um exemplo da utilização de genes repórteres é o modelo bovino para a monitoração quantitativa da reativação transcripcional do gene *POU5F1* em embriões bovinos clonados (Habermann *et al.*, 2007).

Genes codificadores para proteínas fluorescentes, como a GFP, ou então, eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), para a Proteína Fluorescente Amarela (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP), a Azul (*Cyan Fluorescent Protein*, CFP) e a Vermelha (*Discosoma Red Fluorescent Protein*, DsRed), entre outras, são bastante utilizados com este propósito. O gene da eGFP, por exemplo, é usado comumente em estudos que objetivam analisar padrão de expressão gênica em um organismo, seja esta célula, embrião ou animal (Chalfie *et al.*, 1994; Funahashi *et al.*, 2001; Bordonon *et al.*, 2003; Bhuiyan *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004). A GFP tem sido amplamente utilizada como um excelente marcador de seleção para embriões clonados modificados

geneticamente por oferecer a vantagem da confirmação visual simples da expressão gênica, pela excitação de luz no comprimento de onda de 470nm, sem o comprometimento da viabilidade embrionária (Roh *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002; Hyun *et al.*, 2003).

Com a escolha das células doadoras de núcleo apropriadas, características como o sexo ou mesmo a genética animal podem ser pré-determinadas. Deste modo, as células doadoras podem ser manipuladas em cultivo para o controle da expressão de um gene específico e/ou deletar a função de um gene em particular. As células selecionadas podem ser expandidas e estocadas para aplicações posteriores (Shaw e Nakagata, 2002).

Produção de animais transgênicos por transferência nuclear de células somáticas

Apesar dos muitos avanços técnicos, a transferência nuclear ainda apresenta baixa eficiência. Os resultados de obtenção de prenhez a termo a partir de embriões reconstituídos com células somáticas são, em geral, próximos a 5% (Cibelli *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999). Além disso, ocorrem com alta frequência alterações na formação da placenta que resultam em altas taxas de morte embrionária e fetal, abortos ou animais portadores de dificuldades de adaptação à vida pós-natal (Cibelli *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Kues e Niemann, 2004). Demonstrou-se em diversos estudos que a adequada seleção da célula doadora de núcleo pode garantir que a totalidade dos animais nascidos será transgênica, como discutido e citado anteriormente. De acordo com Oback e Wells (2007), já foram obtidas progênes de 15 espécies animais pela transferência nuclear de células adultas, fetais ou embrionárias, como, por exemplo, ovinos (Campbell *et al.*, 1996), bovinos (Kato *et al.*, 1998), camundongos (Wakayama *et al.*, 1998), caprinos (Baguisi *et al.*, 1999), suínos (Polejaeva *et al.*, 2000), gatos (Shin *et al.*, 2002), coelhos (Chesne *et al.*, 2002), ratos (Zhou *et al.*, 2003), equinos (Galli *et al.*, 2003), cervídeos (Berg *et al.*, 2007), cães (Lee *et al.*, 2005a) e furões (Li *et al.*, 2006).

Ovinos portadores do gene codificante para o fator IX de coagulação humana foram os primeiros animais a serem produzidos pela transferência nuclear (Schnieke *et al.*, 1997). Logo em seguida, bovinos portadores de um gene repórter de resistência a antibiótico foram produzidos com sucesso (Cibelli *et al.*, 1998). Desde então, a transferência de núcleo vem sendo a técnica mais utilizada para a produção de bovinos transgênicos (Houdebine, 2005a).

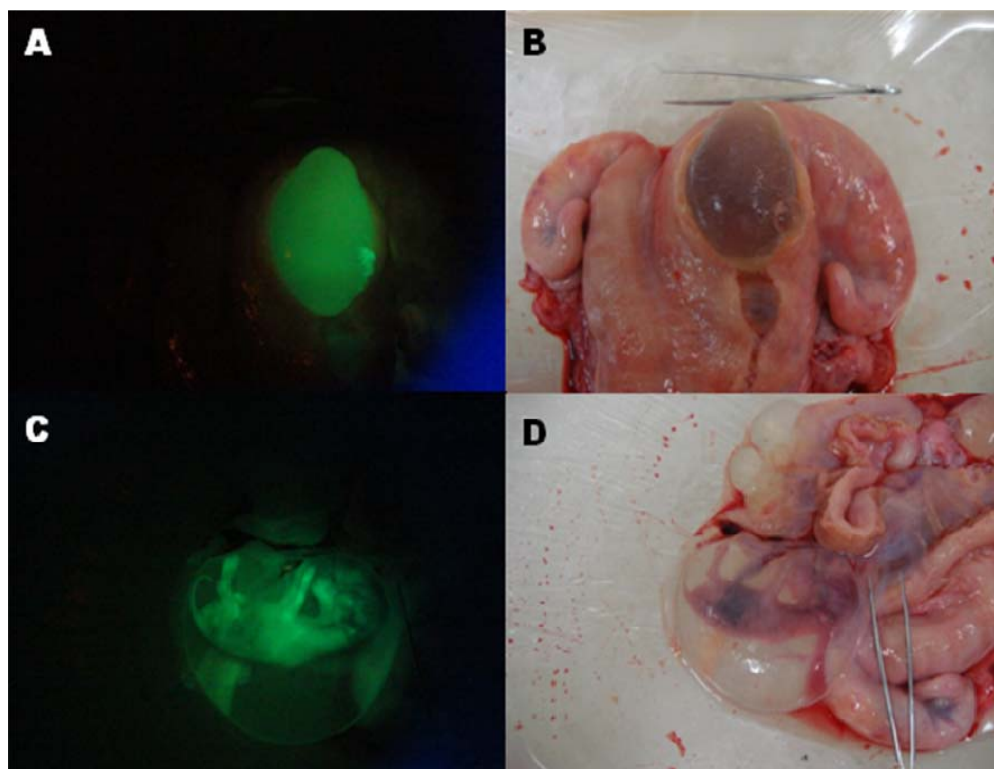


Figura 2: Análise da fluorescência da eGFP. A e B: útero gestante com exposição de parte fetal (coriolantóide). Exposição à luz ultravioleta, comprimento de onda 500 a 515nm e luz branca, respectivamente. C e D: feto bovino com 60d de gestação envolto em líquido e membrana amniótica. Exposição à luz ultravioleta, comprimento de onda 500 a 515nm e luz branca, respectivamente.

Prenhezess bovinas transgênicas também foram estabelecidas pela transferência nuclear no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD, FZEA/USP, dados não publicados). Foram utilizadas como células doadoras de núcleo fibroblastos fetais geneticamente modificados pelo sistema lentiviral portadoras do gene codificador da eGFP. De 1364 oócitos reconstruídos ao total, 17,64% foram competentes no desenvolvimento a blastocisto. Um total de 101 embriões foi transferido individualmente ou em duplas a receptoras, resultando em nove prenhezess aos 30 dias de prenhez, sendo que destas, oito (88,9%) apresentaram o transgene estavelmente no genoma (dados não publicados, Fig. 2). As prenhezess serviram como um modelo biológico adequado para estudos de placentação, sendo interrompidas em idades pré-determinadas.

A produção de animais biorreatores é uma das aplicações almejadas da tecnologia de transferência de genes. No início da década de 80, proteínas humanas começaram a ser produzidas em bactérias recombinantes, porém esta metodologia é limitada por não permitir modificações pós-traducionais adequadas para a produção de certas proteínas. A produção de proteínas recombinantes em células mamíferas, por sua vez, promove um adequado enovelamento de proteína e adequadas modificações pós-traducionais, incluindo glicosilações, o que possibilita a produção de grandes quantidades de proteína funcional a um baixo custo (Makrides, 1999; Houdebine, 2005b).

Ainda na década de 80, percebeu-se que o leite seria um dos melhores sistemas animais para a produção de proteínas em escala industrial a um custo relativamente baixo. Simons *et al.* (1987) obtiveram sucesso na produção de proteína ativadora de plasminogênio tecidual (*tissue plasminogen activator* – TPA) humana ativa e β -lactoglobulina ovina no leite de camundongos.

A evolução foi grande desde então. Hoje há diversos animais de produção biorreatores nascidos, e muitos deles foram produzidos por transferência nuclear. Ovelhas e suínos cujos genes da alfa-1-3-galactosiltransferase (responsável pela rejeição aguda a transplantes) e da proteína priônica PrP, responsável pela doença da “vacca louca” ou encefalite espongiforme, foram removidos do genoma (Denning *et al.*, 2001), ovelhas expressando o fator IX de coagulação (Schnieke *et al.*, 1997), suínos com a remoção do gene da rejeição aguda, visando à utilização de órgãos para xenotransplantes (Dai *et al.*, 2002), bovinos expressando o hormônio de crescimento humano (Salamone *et al.*, 2006), bovinos expressando altos níveis de β e κ -caseína no leite visando ao melhor rendimento na produção de queijo (Brophy *et al.*, 2003), suínos expressando elevados níveis de ômega-3 na carne (Lai *et al.*, 2002), entre outros. Todos estes exemplos foram produzidos pela transferência nuclear utilizando células geneticamente modificadas por transfecção plasmideal. Uma vez que experimentos mais atuais com a transdução celular com vetores lentivirais estão resultando em uma eficiência maior, o tempo necessário para a seleção da célula de interesse pode ser reduzido, como descrito em experimentos com caprinos (Golding *et al.*, 2006) e em bovinos (Hofmann *et al.*, 2004).

De benefício incontestável à humanidade, a produção de proteínas terapêuticas de animais biorreatores é bem estabelecida e os primeiros produtos já estão na fase final de aprovação e prestes a ganhar o mercado (Hunter *et al.*, 2005; Collares *et al.*, 2007). Uma grande variedade de proteínas humanas, totalizando um número aproximado de 100, tem sido expressa no leite de diversas espécies animais, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos e coelhos transgênicos (Dunn *et al.*, 2005; Soler *et al.*, 2006). A antitrombina III humana, produzida em cabras, já foi testada e aprovada como medicamento em agosto de 2006 pela Agência Europeia de Medicamentos (European Medicines Agency, EMEA). Outros exemplos de importantes proteínas recombinantes sendo produzidas são: fator de crescimento semelhante à insulina 1 em coelhos, a antitripsina 1 em ovelhas, α -lactalbumina em vacas, a proteína-C em porcas, o inibidor C1 recombinante em coelhos, entre outras (Rudolph 1999; Niemann e Kues, 2007).

Em conjunto esta revisão nos permite concluir que, aliada à transdução lentiviral, a transferência nuclear de célula somática é uma ferramenta poderosa para a produção de animais clonados geneticamente modificados. (Uhm *et al.*, 2000, 2007). A convergência de biotecnologias como a transferência nuclear e a transferência gênica já possibilita a inserção de modificações precisas no genoma de animais de produção e sua prole, além de assegurar que toda a prole nascida será efetivamente transgênica (Murakami *et al.*, 1999; Uhm *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2002; Hyun *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2007), provendo contribuições importantes para a saúde humana.

Referências

- Baguisi A, Behdoodi 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, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v.59, p.831-839, 2003.
- Berg DK, Li C, Asher G, Wells DN, Oback B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated

progeny. *Biol Reprod*, v.77, p.384-394, 2007.

Bhuiyan MM, Cho J, Jang G, Park E, Kang S, Lee B, Hwang W. Effect of transfection and passage number of ear fibroblasts on in vitro development of bovine transgenic nuclear transfer embryos. *J Vet Med Sci*, v.66, p.257-261, 2004.

Bordignon V, Keystone R, Lazaris A, Bilodeau AS, Pontes JH, Arnold D, Fecteau G, Keefer C, Smith LC. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod*, v.68, p.2013-2023, 2003.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, v.309, p.55-256, 1984.

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Avarbock MR. Translation of globin messenger RNA by the mouse ovum. *Nature*, v.283, p.499-501, 1980.

Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*, v.21, p.157-162, 2003.

Campbell KH, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RD, Lee JH, Xhu, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*, v.68, p.214-231, 2007.

Campbell KH, Mcwhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, p.64-66, 1996.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v.263, p.802-805, 1994.

Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, v.20, p.366- 369, 2002.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, León FAP, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, v.280, p.1256-1258, 1998.

Clark AJ, Burl S, Denning C, Dickinson P. Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res*, v.9, p.263-275, 2000.

Collares T, Seixas FK, Campos VF, Cavalcanti PV, Deschamps JC. Animais transgênicos biorreatores. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.462-478, 2007.

Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Leon FA, Robl JM. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, v.46, p.501-511, 1992.

Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowelllucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, v.20, p.251-255, 2002.

Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, De Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. Deletion of the alpha(1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol*, v.19, p.559-562, 2001.

Dunn DA, Kooyman DL, Pinkert CA. Transgenic animals and their impact on the discovery industry. *Drug Discov Today*, v.10, p.757-767, 2005.

Eglitis MS. Positive selectable markers for use with mammalian cells in culture. *Hum Gene Ther*, v.2, p.195-201, 1991.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Nat Acad Scie*, v.84, p.7413-7417, 1987.

Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet*, v.25, p.217-222, 2000.

Funahashi H, Ideta A, Konishi M, Urakawa M, Uruno K, Aoyagi Y, Okabe M, Niwa K. Nuclear transfer of blastomeres expressing EGFP-reporter gene may improve the efficiency of transgenic cattle. *Cloning Stem Cells*, v.3, p.183-190, 2001.

Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v.424, p.635, 2003.

Golding MC, Long CR, Carmell MA, Hannon GJ, Westhusin, ME. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Nat Acad Sci*, v.103, p.5285-5290, 2006.

Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, v.214, p.1244-1246, 1981.

Gropp M, Itsykson P, Singer O, Ben-Hur T, Reinhartz E, Galun E, Reubinoff BE. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther*, v.7, p.281-287, 2003.

Habermann FA, Wuensch A, Sinowatz F, Wolf E. Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. *Theriogenology*, v.68, p.116-124, 2007.

Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Palmiter RD, Brinster RL. Genetic Engineering of mammalian embryos. *J Anim Sci*, v.63, p.269-278, 1985.

Hendrie PC, Russell DW. Gene targeting with viral vectors. *Mol Ther*, v.12, p.9-17, 2005.

- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, v.51, p.1451-1465, 1999.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther*, v.13, p.59-66, 2006
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*, v.4, p.1054-1060, 2003.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod*, v.71, p.405-409, 2004.
- Houdebine LM. Métodos de gerar animais transgênicos e controle da expressão gênica. In: Collares T. *Animais transgênicos: princípios e métodos*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2005a. p.82-112.
- Houdebine LM. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol*, v.98, p.145-160, 2002.
- Houdebine LM. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*, v.9, p.305-320, 2000.
- Houdebine LM. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.269-281, 2005b.
- Hunter CV, Tiley LS, Sang HM. Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol Med*, v.11, p.293-298, 2005.
- Hyun S, Lee G, Kim D, Kim H, Lee S, Nam D, Jeong Y, Kim S, Yeom S, Kang S, Han J, Lee B, Hwang W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod*, v.69, p.1060-1068, 2003.
- Ikawa M, Tanaka N, Kao WWY, Verma IM. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentivirus vectors for gene therapy. *Mol Ther*, v.8, p.666-673, 2003.
- Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, v.23, p.9-18, 1981.
- Jaenisch R. Transgenic animals. *Science*, v.240, p.1468-1474, 1988.
- Karmali PP, Chaudhuri A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Med Res Rev*, v.27, p.696-722, 2007.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v. 282, p.2095-2098, 1998.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, v.120, p.231-237, 2000.
- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A, Karatzas CN. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod*, v.64, p.849-856, 2001.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Kim T, Lee KK, Han YM. Developmental potential and transgene expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells. *Mol Reprod Dev*, v.58, p.15-21, 2001.
- Kues WA, Niemann H. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol*, v.22, p.286-294, 2004.
- Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I, Robl JM. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol*, v.20, p.889-894, 2002.
- Kwon DJ, Park CK, Yang BK, Kim CI, Cheong HT. Effects of maturational age of recipient oocytes and activation conditions on the development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Anim Reprod Sci*, v.100, p.211-215, 2007.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park K-W, Cheong H-T, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3- galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, v.295, p.1089-1092, 2002.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, v.57, p.717-723, 1989.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, v.436, p.641, 2005.
- Lee GS, Kim HS, Hyun SH, Lee SH, Jeon HY, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Han JY, Ahn C, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Production of transgenic cloned pigs from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, v.63, p.973-991, 2005.
- Li S. Electroporation gene therapy: new developments in vivo and in vitro. *Curr Gene Ther*, v.4, p.309-316, 2004.

- Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF.** Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, v.293, p.439-448, 2006.
- Linney E, Hardison NL, Lonze BE, Lyons S, Dinapoli L.** Transgene expression in zebrafish: A comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. *Dev Biol*, v.213, p.207-216, 1999.
- Lisauskas SF, Rech EL, Aragão FJ.** Characterization of transgene integration loci in transformed Madin Darby bovine kidney cells. *Cloning and Stem Cells*, v.9, p.456-60, 2007.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D.** Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, v.295, p.905-919, 2002.
- Makrides SC.** Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Exp Purif*, v.17, p.183-202, 1999.
- McGrath J, Solter D.** Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool*, v.228, p.355-362, 1983.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H.** Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep*, v.5, p.728-733, 2004.
- Melo EO, Sousa RV, Iguma LT, Franco MM, Rech EL, Rumpf R.** Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. *Genet Mol Res*, v.4, p.812-821, 2005.
- Michalkiewicks M, Michalkiewicks T, Geurts AM, Roman RJ, Slocum GR, Singer O, Weihrauch D, Greene AS, Kaldunski M, Verma IM, Jacob HJ, Cowlwy Jr AW.** Efficient transgenic rat production by lentiviral vector. *Am J Physiol*, v.293, p.881-894, 2007.
- Munõz M, Rodriguez A, De Frutos C, Caamaño JN, Facal N, Gómez E.** Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell lines. *Theriogenology*, v.69, p.1159-1164, 2008.
- Murakami M, Fahrudin M, Varisanga MD, Suzuki T.** Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. *J Vet Med Sci*, v.61, p.843-847, 1999.
- Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Esaki R, Kano K, Saito S, Okabe M, Murakami H.** Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology*, v.59, p.95-106, 2003.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D.** *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, v.272, p.263-267, 1996.
- Niemann H, Kues WA.** Transgenic farm animals: an update. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.762-770, 2007.
- Notarianni E, Laurie S, Ng A, Sathasivam K.** Incorporation of cultured embryonic cells into transgenic and chimeric, porcine fetuses. *Int J Dev Biol*, v.41, p.537-540, 1997.
- Oback B, Wells DN.** Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Mol Reprod Dev*, v.74, p.646-654, 2007.
- Oliveira RR, Carvalho DM, Lisauskas S, Mello E, Vianna GR, Dode MA, Rumpf R, Aragão FJ, Rech EL.** Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. *Genet Mol Res*, v.4, p.185-196, 2005.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM.** Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Biotechnology*, v.24, p.429-433, 1982.
- Park F.** Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*, v.31, p.159-173, 2007.
- Polejaeva IA, Campbell KH.** New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*, v.53, p.117-126, 2000.
- Polejaeva, IA, Chen S-H, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campell KH.** Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v.407, p.86-90, 2000.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL.** Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod*, v.37, p.859-66, 1987.
- Punzon I, Criado LM, Serrano A, Serrano F, Bernad A.** Highly efficient lentiviral-mediated human cytokine transgenesis on the NOD/scid background. *Blood*, v.103, p.580-582, 2004.
- Roh S, Shim H, Hwang WS, Yoon JT.** *In vitro* development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reprod Fertil Dev*, v.12, p.1-6, 2000.
- Romano G.** Current development of nonviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect*, v.20, p.227-231, 2007.
- Rudolph NS.** Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol*, v.17, p.367-374, 1999.
- Rulicke T, Hubscher U.** Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp Physiol*, v.85, p.589-601, 2000.
- Rulicke T, Montagutelli X, Pintado B, Thon R, Hedrich HJ.** FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. *Lab Anim*, v.41, p.301-311, 2007.
- Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernández N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Muñoz L, Alvarez SF, González E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C.** High level expression of

- bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol*, v.124, p.469-472, 2006.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH.** Human factor XI transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, v.278, p. 2130-2133, 1997.
- Seidel GE Jr.** Production of genetically identical sets of mammals: cloning? *J Exp Zool*, v.228, p.347-54, 1983.
- Shaw JM, Nakagata N.** Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods Mol Biol*, v.180, p.207-228, 2002.
- Shiga T, Oppenheim RW.** Close spatial-temporal relationship between islet-1-expressing cells and growing primary afferent axons in the dorsal spinal cord of chick embryo. *J Comp Neurol*, v.405, p.388-393, 1999.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin MA.** Cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, v.415, p.859, 2002.
- Simons JP, McClenaghan M, Clark AJ.** Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, v.328, p.530-532, 1987.
- Soler E, Thépot D, Gervier SR, Joliv-et G, Houdebine LM.** Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod Nutr Dev*, v.46, p.579-588, 2006.
- Uhm SJ, Gupta MK, Kim T, Lee HT.** Expression of enhanced green fluorescent protein in porcine- and bovine-cloned embryos following interspecies somatic cell nuclear transfer of fibroblasts transfected by retrovirus vector. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.1538-1547, 2007.
- Uhm SJ, Kim NH, Kim T, Chung HM, Chung KH, Lee HT, Chung KS.** Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistant (Neo(R)) genes in porcine embryos following nuclear transfer with porcine fetal fibroblasts transfected by retrovirus vector. *Mol Reprod Dev*, v.57, p.331-337, 2000.
- Voss AK, Thomas T, Gruss P.** Germ line chimeras from female ES cells. *Exp Cell Res*, v.230, p.45-9, 1997.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R.** Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, v.394, p.369-374, 1998.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR.** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, v.60, p.996-1005, 1999.
- Wheeler MB.** Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.563-568, 1994.
- Wheeler MB.** Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. *J Anim Sci*, v.81, p.32-37, 2003.
- Willadsen SM.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
- Williams A, Harker N, Ktistaki E, Veiga-Fernandes H, Roderick K, Tolaini M, Norton T, Williams K, Kioussis D.** Position effect variegation and imprinting of transgenes of lymphocytes. *Nucleic Acids Res*, v.36, p.2320-2329, 2008.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Wolf E, Schernthaner W, Zakhartchenko V, Prelle K, Stojkovic M, Brem G.** Transgenic technology in farm animals — progress and perspectives. *Exp Physiol*, v.85, p.615-625, 2000.
- Yang S-H, Agca Y, Cheng P-H, Yang J-J, Agca C, Chan AWS.** Enhanced Transgenesis by Intracytoplasmic Injection of Envelope-Free Lentivirus. *Genesis*, v.45, p.177-183, 2007.
- Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prelle K, Schernthaner W, Stojkovic P, Wenigerkind H, Wanke R, Dühler M, Steinborn R, Mueller M, Brem G, Wolf E.** Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol Reprod Dev*, v.54, p.264-272, 1999.
- Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J.** Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, v.302, p.1179, 2003.
- Zuckerbraun BS, Tzeng E.** Vascular gene therapy: A reality of the 21st century. *Arch Surg*, v.137, p.854-861, 2002.