

Animais transgênicos biorreatores

Transgenic animal bioreactors

Tiago Collares, Fabiana Kömmling Seixas, Vinícius Farias Campos, Paulo Varoni Cavalcanti, João Carlos Deschamps

Laboratório de Biotécnicas da Reprodução Animal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

¹Correspondência: tcollares.cbitec@ufpel.edu.br

Resumo

Conhecimentos de biologia molecular aplicados à reprodução animal têm proporcionado uma revolução em ciência aplicada nos últimos anos. A utilização de ferramentas de bioinformática, clonagem gênica, manipulação de gametas e embriões, bem como purificações de proteínas de fluidos biológicos, têm permitido este avanço significativo. Esta revisão aborda princípios e métodos na geração de animais transgênicos biorreatores e os principais fluidos biológicos utilizados.

Palavras-chave: animais transgênicos, biorreatores, biologia molecular.

Abstract

Knowledge of molecular biology applied to the animal reproduction have been providing a revolution in applied science in the last years. The use of bioinformatics tools, gene cloning, gametes and embryo manipulation, and purifications of proteins of biological fluid, have been allowing this significant progress. This revision approaches principles and methods in the generation of transgenic animal bioreactors and main biological fluid in use.

Keywords: *transgenic animal, bioreactors, molecular biology.*

Introdução

Na década de 80, foram demonstradas as primeiras tentativas de geração de animais transgênicos, incluindo camundongos, ovelhas, coelhos e porcos com potencial de expressão protéica exógena (Gordon *et al.*, 1980; Gordon e Ruddle, 1981; Hammer *et al.*, 1985; Palmiter *et al.*, 1982). Desde então, a produção de diversas proteínas recombinantes de interesse farmacêutico tem sido descrita em animais transgênicos gerados por ferramentas da biologia molecular em conjunto com biotécnicas reprodutivas avançadas.

A utilização de animais transgênicos como biorreatores representa uma alternativa promissora para possibilitar o crescimento necessário à terapêutica, por meio da produção de proteínas recombinantes de elevado valor biológico à saúde humana. A rápida expansão e o crescimento da biotecnologia, nos recentes anos, proporcionaram a expressão de uma variada gama de polipeptídeos em diferentes sistemas biológicos de produção, dirigidos principalmente à saúde humana (Andersen e Krummen, 2002; Collares *et al.*, 2005; Dunn *et al.*, 2005; Houdebine, 2000; Keefer, 2004; Wall, 1999).

Embora muitas proteínas terapêuticas humanas sejam, atualmente, produzidas em fermentadores microbiológicos, usando técnicas de DNA recombinante, é nítido que o processamento microbiano não se mostra adequado para um grande número de proteínas bioativas. Isso ocorre devido à incapacidade das bactérias realizarem reações de modificações pós-sintéticas, requeridas para a atividade biológica plena. Diante disso, para a síntese de uma série de proteínas de interesse terapêutico, há a pertinência do uso de células animais, para que as modificações pós-traducionais adequadas sejam realizadas. A glicosilação, por exemplo, normalmente é requerida para a atividade biológica das proteínas. Este é o caso para hormônios gonadotróficos, fatores da coagulação e para anticorpos. Além disso, a glicosilação mostra-se essencial para a estabilidade de muitas proteínas na circulação sanguínea (Dyck *et al.*, 2003).

Linhagens de células de mamíferos são capazes de realizar as complexas modificações pós-traducionais. É importante considerar que os fatores de coagulação recombinantes têm sido produzidos por meio de cultivo de células de rim de *hamster*, sendo transfeccionadas por vetores contendo o gene de interesse. Porém, o cultivo de células modificadas de mamíferos apresenta um custo significativamente elevado ao produto final - proteína recombinante - quando comparado à produção em alguns modelos de biorreatores animal (Fan e Watanabe, 2003; Niemann *et al.*, 1999).

Diversos tecidos e fluidos corporais de mamíferos demonstram potencial para produção de proteínas exógenas por engenharia genética animal e, mais recentemente, em ovos de peixes biorreatores (Hwang *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2004; Yoshizaki *et al.*, 2005). É importante registrar que um dos mais promissores avanços para a produção em larga escala de proteínas recombinantes tem sido a secreção de proteínas recombinantes no leite de mamíferos transgênicos. Isto tem sido relatado para uma série de proteínas, sejam em vacas, cabras,

ovelhas, porcas, coelhas ou camundongas (Houdebine, 2002b).

O uso de peixes transgênicos, como biorreatores, também tem demonstrado ser uma alternativa viável para produção de proteínas recombinantes em modelos de baixo custo: (1) tempo de geração curto; (2) custo comparativamente baixo; (3) fácil manutenção dos estoques; (4) produção em larga escala dos animais geneticamente modificados através de SMGT - *Sperm Mediated Gene Transfer*; (5) transmissão de vírus e *prions* não são conhecidas até o momento entre peixes e humanos (Caelers *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2004).

O uso comercial de aves transgênicas, por exemplo, está direcionado para duas grandes áreas. A primeira é o desenvolvimento da galinha para atuar como um biorreator na produção de proteínas exógenas em claras de ovos e, a segunda, é a manipulação de características de produção. Nesta última, o mais provável uso da transgênese seria a obtenção de aves resistentes a doenças. Várias metodologias vêm sendo utilizadas para acessar e manipular o genoma de aves em diferentes estágios do desenvolvimento, incluindo: i) a manipulação direta das gônadas; ii) a modificação dos espermatozoides; iii) a manipulação do zigoto; iv) a manipulação de embriões no momento da postura; v) a transfecção de células-tronco embrionárias ou células germinativas primordiais modificadas (Ivarie, 2006; Lillico *et al.*, 2005; Mozdziak e Petite, 2004).

Esta revisão pretende abordar as principais metodologias de geração de animais transgênicos e os principais fluidos biológicos utilizados como biorreatores de proteínas de interesse.

Estratégias de gerar animais transgênicos

O DNA constitui-se em uma macromolécula que não apresenta propriedades que facilitem sua entrada nas células. Métodos mecânicos ou físico-químicos devem, por isso, ser implementados para permitir a incorporação de DNA em células *in vitro* ou *in vivo*. Por outro lado, para ser transgênico, um animal deve apresentar o DNA exógeno em todas as suas células, incluindo os gametas, para permitir a transmissão à progênie. O DNA exógeno deve, assim, estar presente em embriões de uma célula, qualquer que seja o método utilizado para a transferência gênica (Collares *et al.*, 2005)

Os embriões são células relativamente raras, e o método mais eficiente para a transferência de genes em células cultivadas é a microinjeção. A microinjeção de DNA no pró-núcleo de embriões de uma célula foi o primeiro método a ser utilizado para DNA não viral. Proposto por Gordon *et al.* (1980) em camundongos e disseminado para três outros mamíferos (coelhos, suínos e ovelhas) ainda nos anos 80 (Hammer *et al.*, 1985), esse método obteve pouco progresso, mas ainda é utilizado com sucesso em várias espécies até os dias atuais. Esta técnica requer que numerosos embriões estejam disponíveis para a microinjeção e que sejam transferidos cirurgicamente para fêmeas receptoras. Os embriões são geralmente obtidos por superovulação, e as fêmeas receptoras estarão prontas para receber embriões exógenos, após cruzamento com machos vasectomizados ou após tratamento hormonal de acordo com a espécie. Os embriões de uma célula são transparentes em camundongos, ratos e coelhos. Eles são opacos em suínos, cabras, ovelhas e vacas devido à presença de glóbulos de lipídios. Os embriões devem, então, ser centrifugados a 10.000g para concentrar os lipídios em um lado do embrião, permitindo a visualização do pró-núcleo para microinjeção do DNA exógeno. Neste sentido, uma série de detalhes devem ser levados em consideração na eleição de modelos biológicos transgênicos biorreatores (Keefer, 2004).

Não mais do que 1.000 cópias de DNA exógeno devem ser injetadas em embriões de camundongos, sendo que mais de 5.000 cópias podem ser injetadas em embriões de coelhos e suínos, com o aumento de produtos transgênicos. Um cuidado particular deve ser tomado ao preparar DNA para ser microinjetado, levando em consideração seu grau de pureza. Isso pode ser obtido pela separação do inserto do plasmídeo em um gel de agarose de alta concentração na ausência de brometo de etídio. O DNA pode então ser purificado do gel de agarose, usando microcolunas disponíveis. Nas manipulações com embriões, é preferível o uso de água purificada. Para grandes fragmentos de DNA, como cromossomos artificiais (BAC e YAC), a separação do inserto deve ser feita em agarose, utilizando-se campo pulsátil. A agarose é, então, digerida por agarase, e a fração é extensivamente dialisada numa membrana de nylon usando um tampão rico em poliamida (Giraldo e Montoliu, 2001).

O DNA exógeno introduzido no pró-núcleo é altamente mitogênico. Isto induz à morte de uma grande proporção de embriões (30% ou mais). Rearranjos desconhecidos do genoma e mutações também ocorrem no sítio de integração. A produção média de transgênese, após microinjeção de DNA no pró-núcleo, é de 2% para camundongos (Montoliu *et al.*, 2004; Palminter *et al.*, 1982), 0,1 a 0,5% para suínos (Nagashima *et al.*, 2003), 0,01 a 0,1% em cabras e ovelhas (Baldassarre *et al.*, 2003; Keefer, 2004) e ainda mais baixo para vacas (Niemann *et al.*, 2005).

Em vertebrados inferiores e invertebrados e, geralmente, em espécies ovíparas, os ovos são envolvidos por uma casca, e a célula contém uma grande quantidade de vitelo. Neste sentido, os pró-núcleos não são visíveis, e a injeção de DNA pode ser melhor realizada no citoplasma, após transpassar a casca. Cerca de 10^6 – 20×10^6 cópias dos genes exógenos são injetados no citoplasma, de acordo com a espécie, para otimizar a transgênese (Houdebine, 2002b).

Os genomas de lentivírus têm sido descritos como forma alternativa. Isso permite a integração do gene exógeno não somente em células em multiplicação, como fazem os vetores de retrovírus convencionais, mas

também em células que não estão se dividindo. Além disso, os vetores lentivirais podem incorporar até 9 kpb de DNA exógeno e, por razões desconhecidas, esses vetores integrados são menos suscetíveis à extinção do gene do que vetores de retrovírus convencionais. A eficiência desses novos vetores também tem sido aumentada pelo uso de envelopes de VSV (vírus da estomatite vesicular), que reconhece fosfolipídios da membrana plasmática e não receptores específicos. Além do mais, as partículas de retrovírus, contendo envelopes de VSV, podem ser concentradas por meio de centrifugação, mantendo sua capacidade de infectar células. Esses novos vetores podem assim infectar qualquer tipo celular, incluindo embriões, com uma alta eficiência. Tal instrumento foi implementado pela primeira vez com embriões de camundongo e foi estendido e descrito para aves (Koo *et al.*, 2004; Mizuarai *et al.*, 2001), suínos (Hofmann *et al.*, 2003; Lunney, 2007), bovinos (Ewerling *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2004) e ovinos (Robl *et al.*, 2007).

Em relação à transferência gênica em massa, os espermatozoides parecem ser as células mais apropriadas. Os diferentes métodos baseados no uso de espermatozoides são conhecidos como espermatotransgênese ou SMGT (*Sperm Mediated Gene Transfer*) (Collares *et al.*, 2005; Lavitrano *et al.*, 1989). Experimentos conduzidos há mais de uma década têm demonstrado que a incubação de espermatozoides isolados, seguida por fertilização *in vitro*, originou camundongos transgênicos. Esse método, relativamente simples, apresentou eficiência em peixes, aves, camundongos, coelhos e bovinos (Celebi *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2002; Collares *et al.*, 2005; Lavitrano *et al.*, 1989; Shemesh *et al.*, 2000; Fig. 1). Um complexo de DNA transfectante, injetado nos túbulos seminíferos de camundongos, permitiu o nascimento de camundongos transgênicos em um número aceitável (Muramatsu *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1999). Espermatogônias podem ser extraídas dos testículos, transfectadas com DNA exógeno *in vitro*, selecionadas e implantadas nos testículos de um animal pré-tratado (Dupuy *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2002).

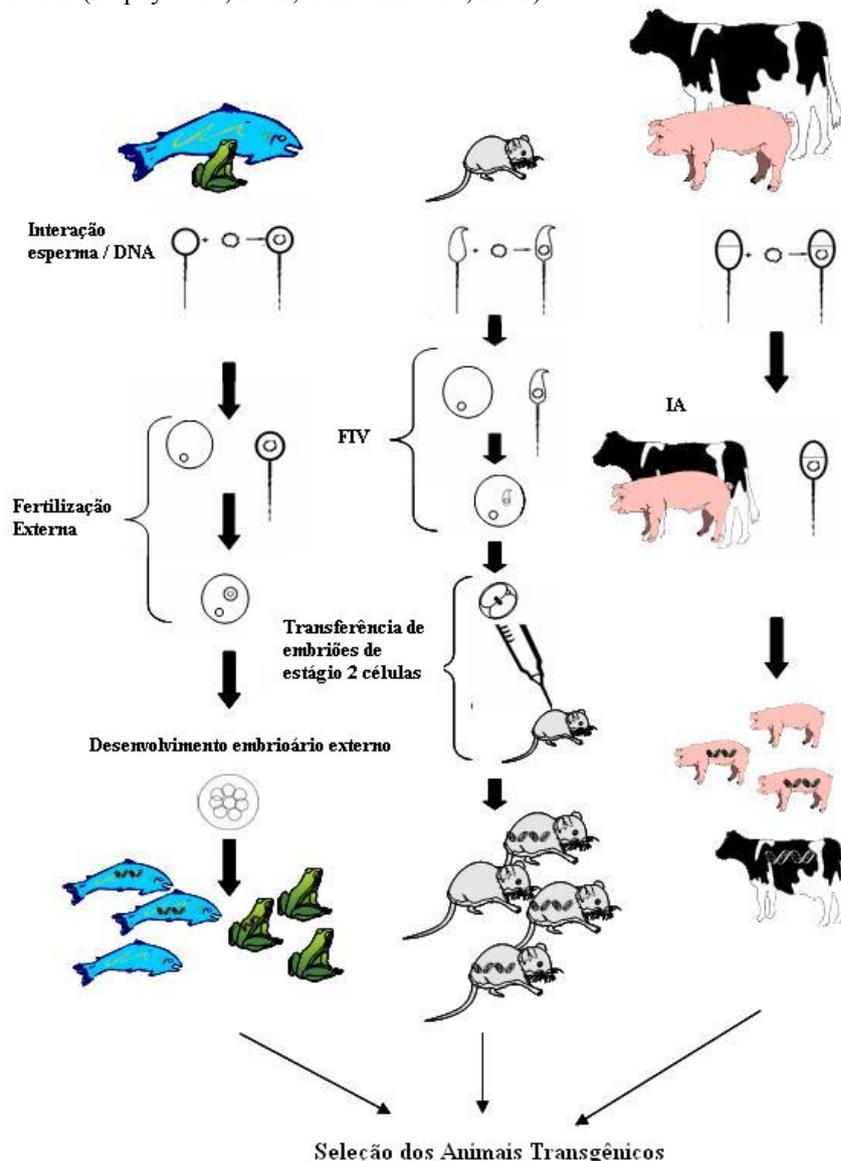


Figura 1. Esquema demonstrativo dos eventos de transferência gênica em massa baseada em células espermáticas para gerar animais transgênicos biorreatores.

Um fator inibitório específico (IF-1) da reação de ligação do DNA foi identificado no fluido seminal de mamíferos e na superfície da membrana de espermatozóide de espécies menos desenvolvidas, por exemplo, ouriço-do-mar, que não possui fluido seminal. IF-1 é uma glicoproteína, cuja efetividade inibitória está ligada ao componente polissacarídeo. De fato, a habilidade do IF-1 em inibir a ligação do DNA pode ser completamente eliminada pela pré-incubação com glicosidases. O IF-1 liga-se ao segmento subacrossomal da cabeça do espermatozóide, ou seja, a mesma localização celular alvejada pelo DNA exógeno, e pode exercer seu efeito inibitório tanto em espermatozoides heterólogos quanto em homólogos. Assim sendo, o IF-1 exerce um importante papel natural, atuando como uma barreira e protegendo os espermatozoides epididimais da entrada de moléculas exógenas indesejáveis que poderiam comprometer a integridade do espermatozóide e a identidade genética da futura progênie (Chang *et al.*, 2002; Magnano *et al.*, 1998; Spadafora, 1998).

Por outro lado, a ligação de DNA exógeno aos espermatozoides parece ser mediada por uma classe de proteínas espermáticas, com peso molecular de 30-35 kDa, localizadas na membrana celular do espermatozóide. Com base em estudos de ligação do DNA, essas proteínas atuam verdadeiramente como substratos à ligação de DNA, formando complexos estáveis com o DNA. É através destas proteínas que o DNA exógeno liga-se à cabeça dos espermatozoides maduros, sendo que 15 a 22% do DNA ligado tornam-se posteriormente internalizados no núcleo do espermatozóide (Carballada e Esponda, 2001). Por autoradiografia, a internalização nuclear do DNA exógeno ocorre de forma ampla e, aparentemente, envolve a maioria do núcleo espermático após 2 horas de incubação. A autoradiografia ultraestrutural de seções de espermatozoides de epidídimo de ratos, de ejaculados de bovinos e de espermatozoides lavados após incubação com DNA marcado, indica que o DNA exógeno é internalizado no núcleo e transferido à cromatina do espermatozóide (Rieth *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003).

Tais observações sugerem que a internalização nuclear do DNA exógeno não é uma transferência passiva ou desordenada (ou seja, como a difusão), mas, ao contrário, é regulada por etapas bem definidas. Acredita-se que as moléculas de DNA exógeno interagem com proteínas de ligação ao DNA (DBP) na superfície do espermatozóide, quando não inibidas na presença do IF-1 do fluido seminal. A formação de complexos protéicos DNA / DBP ativa a internalização mediada por CD4. Neste ponto, o complexo DNA / DBP / CD4 penetra na membrana nuclear e, através dos poros nucleares, alcança a matriz nuclear, onde o DNA é dissociado do complexo DBP / CD4 e liberado, em contato íntimo com o DNA cromossômico do espermatozóide: aqui ele pode ser integrado ou retido como DNA epissômico (Lavitrano *et al.*, 1997; 2006; Smith e Spadafora, 2005).

Uma das funções endógenas que eram desconhecidas do espermatozóide, mas que foi revelada após a interação com moléculas ácidas nucleares exógenas é a atividade da transcriptase reversa (*RT - Reverse Transcriptase*) (Giordano *et al.*, 2000; Sciamanna *et al.*, 2003).

Originalmente, acreditava-se que uma RT não telomérica estava associada somente com a replicação de retrovírus. Mais tarde, descobriu-se que sua codificação é realizada por duas grandes classes de elementos repetidos em genomas de eucariotos superiores: retroposons como os da família LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*) e retrovírus endógenos. Essas famílias de seqüências repetidas são coletivamente indicadas como retroelementos. A RT não telomérica possui a função principal no mecanismo de retrotransposição destes elementos; se a RT endógena possui outros papéis fisiológicos em células eucarióticas, é uma questão em aberto (Beraldi *et al.*, 2006; Sciamanna *et al.*, 2003).

Dados recentes do seqüenciamento do genoma humano e dos murinos demonstram que uma quantidade de 45% do genoma humano e 37% do genoma murino são compostos por retroelementos. Isso sugere que a RT endógena pode ter participado e pode ainda estar participando em um papel de contínuo remodelamento e rearranjo dos genomas. Embora um papel fisiológico para a RT endógena ainda não tenha sido claramente definido, um aumento nas evidências sustentam a idéia de que essa enzima é responsável por numerosas alterações genômicas e é uma das maiores forças que determinam a evolução (Spadafora, 1998; 2004).

Atualmente, níveis elevados de atividade RT têm sido observados em anexos embrionários, como placenta, e em tumores; em contraste nenhum, ou níveis muito baixos de expressão de RT, são típicos de células diferenciadas. A única exceção conhecida a essa regra é o epidídimo de camundongo no qual, em contraste, a RT é altamente expressa (Smith e Spadafora, 2005).

Experimentos utilizando diferentes plasmídeos, apresentando três genes repórteres distintos, demonstram uma elevada eficiência nas taxas de transgênese usando SMGT para gerar suínos transgênicos. Os animais gerados a partir da inserção de múltiplos genes são denominados de multitransgênicos (Webster *et al.*, 2005).

É importante considerar que o sucesso na geração de animais transgênicos por meio da SMGT depende diretamente das relações entre concentração de DNA/ concentração espermática; pureza do DNA; morfologia e proporção de DNA exógeno (circular:linear) e adjuvantes de transfecção (DMSO, DMA, Lipossomos) (Sciamanna *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006). A Tab. 1 demonstra os principais eventos em SMGT.

Outra metodologia bastante interessante e utilizada em transferência gênica *in vivo* é a TMGT (*Testis Mediated Gene Transfer*). A transferência de genes, mediada pelos testículos, pode ser considerada como uma variação simplificada do SMGT, visto que não requer procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) nem de transferência de embriões (TE). Camundongos e coelhos transgênicos foram produzidos por monta natural de fêmeas selvagens com machos pré-injetados com DNA exógeno, puro ou complexado com lipossomas, dentro

de seus ductos deferentes (Sato *et al.*, 1999; 2002; Yonezawa *et al.*, 2001; Hibbitt *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006). Em aves, essa técnica foi demonstrada viável por meio de injeções intratesticulares de DNA exógeno (Arima *et al.*, 2001).

Tabela 1. Interação entre células espermáticas e moléculas de DNA exógeno em várias espécies, usando protocolos diferentes.

Classes	Espécies	Métodos de transfecção espermática
Equinodermas	Ouriço-do-mar	Incubação - Espermatozóide /DNA;
Moluscos	Abalone	Eletroporação de espermatozóides;
Insetos	Mosca	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	Bicho-da-seda	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	<i>Lucilia cuprina</i>	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	<i>Apis mellifera</i>	Incubação - Espermatozóide /DNA;
Peixes	Carpas	Incubação - Espermatozóide /DNA; Eletroporação de espermatozóides;
	African catfish	Eletroporação de espermatozóides;
	Tilápia	Eletroporação de espermatozóides;
	Zebrafish	Eletroporação de espermatozóides;
	Salmão	Eletroporação de espermatozóides;
	Loach	Eletroporação de espermatozóides;
Anfíbios	<i>Xenopus laevis</i>	Incubação - Espermatozóide /DNA; REMI;
Aves	Galos	Incubação - Espermatozóide /DNA; Eletroporação de espermatozóides; Lipofecção de espermatozóides; REMI; LB-SMGT;
	Camundongos	Incubação - Espermatozóide /DNA; Lipofecção de espermatozóides; ICSI; LB-SMGT;
Mamíferos	Coelhos	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	Ovinos	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	Caprinos	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	Suínos	Incubação - Espermatozóide /DNA; Eletroporação de espermatozóides;
	Bubalinos	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	Bovinos	Incubação - Espermatozóide /DNA; Eletroporação de espermatozóides;
	Humanos	Incubação - Espermatozóide /DNA;
	Macaco <i>Rhesus</i>	ICSI;

O DNA exógeno pode ser transfecado em células-tronco ou em células somáticas que são selecionadas e introduzidas em embriões. Os animais resultantes são quiméricos e mosaicos para o transgene (McCreath *et al.*, 2000). Algumas das células germinativas contêm o transgene, que é transmitido para a progênie. A transferência gênica por transferência nuclear utilizando células-tronco em camundongos é um método menos eficiente do que a clássica microinjeção. Essa técnica laboriosa está, então, restrita à modificação de genes que requerem recombinação homóloga e *knockout*. No entanto, resultados obtidos em bovinos, ovinos, caprinos e suínos demonstram que a maioria dos animais clonados a partir de células somáticas expressa o transgene (Lai e Prather, 2002; Bordignon *et al.*, 2003; Nagashima *et al.*, 2003).

Independente da metodologia utilizada na geração do exemplar transgênico, é importante considerar a construção gênica que se pretende inserir no genoma hospedeiro. A integração aleatória pode levar ao desarranjo e inativação do gene hospedeiro. Além disso, a expressão do transgene é freqüentemente submetida à ação dos elementos regulatórios vizinhos dos genes hospedeiros (Houdebine, 2002b). Nesse sentido, é altamente desejável direcionar a integração do gene exógeno. Isto pode ser obtido utilizando-se diferentes métodos.

A introdução de genes exógenos por meio do sistema Cre-LoxP ou o cognato Flp-FRT teoricamente pode direcionar para qualquer região do genoma. Para alcançar este objetivo, o DNA exógeno deve ser flanqueado por duas seqüências exatamente iguais à região almejada do genoma hospedeiro. Esse protocolo é correntemente utilizado para inativar seletivamente genes hospedeiros. Mais de 5.000 genes foram assim eliminados em camundongos. Essa metodologia é conhecida como *knockout* gênico (Kos, 2004; Wolf e

Woodside, 2005). A recombinação homóloga necessária para direcionar o gene é muito menos freqüente do que a recombinação ilegítima que leva à integração aleatória. As células nas quais as substituições de genes ocorreram devem ser selecionadas e devem ter mantido sua capacidade de gerar organismos vivos, por meio da formação de animais quiméricos ou clonados. Alguns experimentos conduzidos com células de cultivo transfectadas, bem como com animais transgênicos, contribuíram para identificar promotores capazes de expressar genes exógenos em tipos específicos de células e tecidos, sob a ação de indutores específicos. O seqüenciamento completo do genoma de vários animais, bem como de fragmentos de DNA para avaliar expressão gênica, está proporcionando aos cientistas um número cada vez maior de promotores de genes para direcionar a expressão exógena a tecidos e fluidos biológicos de interesse (Bell *et al.*, 2001; Kues e Niemann, 2004; Li *et al.*, 2006).

A especificidade de uma região promotora pode ser parcial, se elementos regulatórios essenciais, localizados a longa distância, não estiverem presentes nas construções gênicas. Além disso, a expressão do transgene é freqüentemente modulada pela presença, em suas proximidades, de *enhancers* de genes endógenos (Houdebine, 2004; Montoliu *et al.*, 2004). O mesmo transgene pode, assim, ter vários padrões de expressão nas diferentes linhagens de animais transgênicos. Isso pode reduzir a relevância dos modelos experimentais. No melhor dos casos, tais artefatos podem, fortuitamente, gerar situações fisiológicas inesperadas, que revelem funções desconhecidas de um gene.

Animais transgênicos como biorreatores

Técnicas utilizando bactérias como modelos biológicos de biorreatores demonstraram características importantes: fácil manipulação e crescimento em qualquer escala. Porém, suas habilidades em relação a modificações pós-traducionais são significativamente limitadas. Determinados sistemas eucarióticos, como alguns fungos fermentativos, fungos filamentosos e algas unicelulares, podem ser produzidos em larga escala sendo capazes de realizarem modificações pós-traducionais necessárias a muitas proteínas complexas. No entanto, esses sistemas estão freqüentemente limitados em relação a sua habilidade celular em simular os padrões do processamento de proteínas humanas de interesse. Inclusive, podem gerar produtos recombinantes com propriedades indesejáveis, como imunogenicidade ou ausência de bioatividade protéica (Dyck *et al.*, 2003).

Sistemas celulares de insetos são usados geralmente em escala laboratorial, tendo alguns destes demonstrado um significativo rendimento na produção de proteínas recombinantes (Tomita *et al.*, 2003). Por outro lado, apresentam um padrão de glicosilação diferenciado em relação ao realizado por células de mamíferos e peixes.

O cultivo de células de mamíferos foi uma alternativa interessante para resolver os problemas dos padrões diferenciados na execução das modificações pós-traducionais. Entretanto, quando esse sistema é transportado a propósitos de produção em larga escala, torna o custo extremamente alto, inviabilizando a produção de proteínas recombinantes neste sistema (Niemann *et al.*, 2005).

Com base nesse resumo de características biológicas ou econômicas, surgiu uma alternativa em potencial, apesar de ainda ter de cruzar muitas barreiras reguladoras: a produção de animais transgênicos como modelos de biorreatores de proteínas com elevado valor biológico. Tal processo é oneroso, mas a relação custo - benefício mostra-se favorável, pois após o animal ser produzido, pode reproduzir-se e propagar o gene de interesse a sua progênie, de acordo com os princípios mendelianos básicos (Wall *et al.*, 2000).

A possibilidade de animais transgênicos expressarem proteínas em determinados órgãos, utilizando-se promotores tecido-específicos, torna-os viáveis como biorreatores de proteínas de importância biomédica. Animais de produção podem servir como biofábricas na produção em larga escala de proteínas expressas na urina ou no leite. O isolamento de proteínas expressas nos fluidos corporais apresenta vantagens sobre os tecidos, pois estes são constantemente produzidos e aquelas são facilmente recuperadas, quando comparado aos tecidos (Wheeler *et al.*, 2003).

Algumas proteínas complexas como proteína C, fatores da coagulação (FVII, FVIII e FIX), hemoglobina, transferrina, antitrombina, albumina e alfa 1-antitripsina, hormônio do crescimento humano (GH), entre outras, têm sido produzidas em diferentes fluidos corporais de animais geneticamente modificados (Kerr *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006; Niemann *et al.*, 1996; 1999; Ryoo *et al.*, 2001). O que parece determinar o sucesso da expressão gênica é limitado por fatores pós-traducionais, e esses fatores são dependentes do potencial tecidual das células do biorreator de eleição (Montoliu *et al.*, 2004). A Tab. 2 resume os principais eventos e estudos ao longo das últimas décadas em transgênese animal.

Os principais fluidos biológicos utilizados pela engenharia genética animal são: leite, urina, sangue, plasma seminal, fluidos de insetos, claras de ovos de aves, ovas e embriões de peixes.

Tabela 2. Resumo dos principais eventos e estudos ao longo das últimas décadas em transgênese animal.

Data	Principais eventos
1980	Camundongos transgênicos por microinjeção
1985	Coelhos, suínos e ovelhas transgênicos por microinjeção
1986	Peixes Transgênicos por microinjeção
1987	Direcionamento da Expressão ao leite / estudos de promotores gênicos
1988	SMGT (Sperm Mediated Gene Transfer)
1989	Aves Transgênicas por transferência de células germinativas primordiais
1990	Ratos Transgênicos biorreatores com expressão na glândula mamária
1991	Vacas Transgênicas biorreatores com expressão na glândula mamária
1992	Cabras Transgênicas biorreatores com expressão na glândula mamária
1997	Transgênese via clonagem
2000	TMGT (Testis Mediated Gene Transfer)
2001	“enviropigs”
2002	Estudos com vetores lentivirais
2003	Avanços significativos com sistemas Cre-Lox de integração genômica
2004	Estudos de regiões proximais e distais de promotores gênicos
2005	Divulgação de resultados com suínos multitransgênicos
2006	Estudos de estabilidade protéica em fluidos biológicos biorreatores
2007...	Foco em construções gênicas estáveis e em cromossomos artificiais

Leite

A abordagem mais bem-sucedida até agora para a produção de proteínas recombinantes em animais transgênicos utiliza animais de fazenda, como vacas, ovelhas, cabras ou porcas, com o gene clonado ligado ao promotor da β -lactoglobulina do animal. Esse promotor é ativo no tecido mamário, o que significa que a proteína será secretada no leite (Bodrogi *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que o tecido mamário pode ser o sítio de produção de uma variedade de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico, independente da complexidade das moléculas (Andersen e Krummen, 2002; Dyck *et al.*, 2003; Houdebine *et al.*, 2002; Houdebine, 2004). A Fig. 2 demonstra, de forma esquemática, o princípio de geração deste modelo de biorreação.

Alguns autores consideram a produção de proteínas recombinantes no leite um dos melhores modelos de biorreatores animal pela praticidade de obter grandes volumes de leite para extração do produto biológico de interesse e pelo sistema de produção leiteiro já estabelecido no mundo (Houdebine, 2005; Wheeler *et al.*, 2003).

A glândula mamária apresenta uma série de vantagens, visto que as proteínas do leite não circulam no corpo do animal; as proteínas como κ -caseína e β -lactoglobulina são expressas em abundância e exclusivamente na glândula mamária. Assim, proteínas heterólogas podem ser expressas nas glândulas mamárias, clonando seus respectivos genes em vetores que contenham promotores e elementos regulatórios dos genes que codificam para proteínas no leite (Bodrogi *et al.*, 2006; Houdebine *et al.*, 2002; Houdebine, 2004).

Diversos trabalhos utilizando como modelos de biorreatores, vacas (Hyvonen *et al.*, 2006a; b), ovelhas (Niemann *et al.*, 1999), cabras (Baldassarre *et al.*, 2003), porcas (Park *et al.*, 2006) e camundongas transgênicas (Yu *et al.*, 2006) têm sido realizados, direcionando a expressão de uma gama significativa de genes de interesse. Por exemplo, os fatores VIII e IX da coagulação sanguínea humana, alfa 1-antitripsina foram produzidos no leite de ovelhas transgênicas; o ativador de plasminogênio humano ativo biologicamente, no leite de cabras transgênicas; e a proteína C com atividade anticoagulante e a hemoglobina humana, no leite de porcas transgênicas.

Estratégias utilizando construções com vetores de expressão, contendo o promotor da β -lactoglobulina (beta-Lac) de ovino, fusionado ao cDNA do FVIII, com íntrons do gene de murino metalotionina (Mtl) têm sido usadas. Geralmente essas construções são usadas para gerar animais fundadores os quais transmitem o transgene de forma mendeliana para a F1. A proteína recombinante (FVIII) pode ser detectada no leite das fêmeas ovinas da F1 em concentrações de 4-6 ng/ml de leite (Houdebine, 2005).

A produção do FIX no leite também foi demonstrada, utilizando o promotor, éxon 1, íntron 1 e éxon 2 do gene beta caseína de cabra, fusionado ao cDNA hFIX, para gerar fundadores transgênicos por microinjeção e transferência de embriões em camundongas. A expressão no leite das camundongas foi de 52.9 mg/l e com alta atividade biológica em testes *in vitro* de coagulação. Nesse estudo, ainda foi possível observar que o transgene integrou em diferentes cromossomos dos camundongos (Huang *et al.*, 2005).

Esses estudos com moléculas biológicas complexas demonstram que a glândula mamária pode servir de biorreator à produção de proteínas recombinantes bioativas. Isso se deve à maquinaria do tecido mamário ser capaz de realizar modificações pós-traducionais complexas como glicosilação e carboxilação (Lindsay *et al.*, 2004; Mikus *et al.*, 2001). Alguns estudos têm demonstrado a viabilidade na produção de anticorpos recombinantes no leite (Houdebine, 2002a; Pollock *et al.*, 1999).

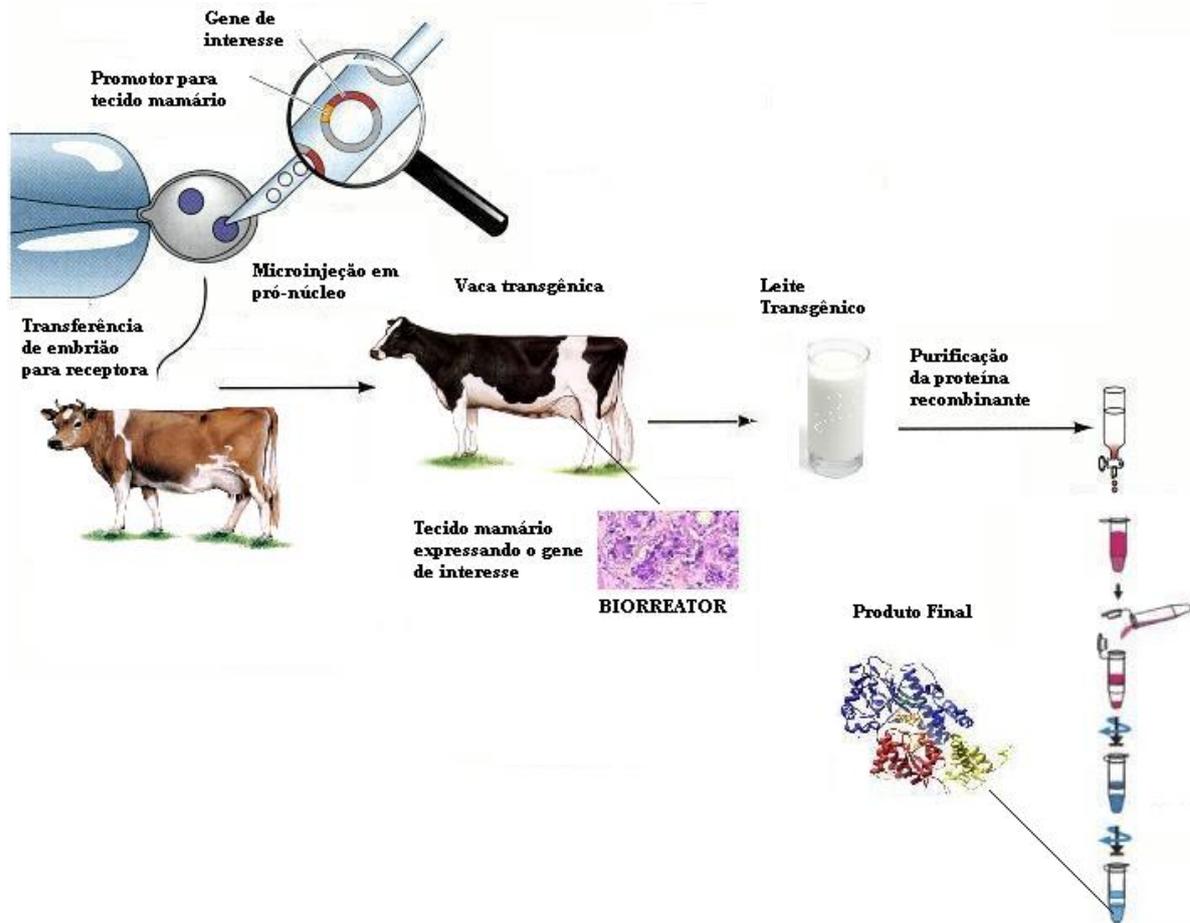


Figura 2. Esquema de produção de proteínas recombinantes em glândula mamária utilizando tecnologia de microinjeção em embriões de bovinos.

Por outro lado, a produção de proteínas recombinantes no leite de vacas está limitada não somente ao intervalo entre o nascimento e a primeira lactação, como ainda a natureza descontínua da lactação, bem como o tempo e aos altos custos e investimentos para manter animais de elevada performance leiteira. Em ovelhas e porcas, a produção de proteínas de interesse no leite parece ser uma alternativa mais barata, mas o número de animais necessários para a mesma produção adquirida em modelos bovinos é bem maior. Apesar de a glândula mamária apresentar um elevado potencial de produzir proteínas bioativas, promove a toxicidade dessas moléculas à saúde do animal biorreator (Dyck *et al.*, 2003; Van Cott *et al.*, 1999; 2001).

O uso da tecnologia de transgênicos em cabras, apenas foi reportado em aplicações farmacológicas, por exemplo, o uso de cabras transgênicas como biorreatores para a produção de proteínas recombinantes valiosas, de interesse farmacêutico e biomédico. Neste sentido, as cabras oferecem uma vantagem significativa sobre as ovelhas, visto que são eficientes produtoras de leite (500 a 1000 litros de leite por lactação) e, comparadas com as vacas, oferecem menor custo de manutenção, maturidade sexual mais cedo e menor comprimento de gestação (Baldassarre *et al.*, 2003). É estipulado que os custos para produzir uma vaca transgênica por microinjeção pronuclear é de US\$ 546.000, comparado com US\$ 60.000 para produzir uma ovelha/cabra transgênica. Portanto, cabras são animais próprios para a produção de proteínas recombinantes requeridas em várias centenas de quilogramas por ano, enquanto vacas transgênicas seriam mais apropriadas para proteínas requeridas em grandes quantidades, como albumina sérica humana, com uma demanda estimada de várias toneladas métricas por ano (Baldassarre *et al.*, 2004).

Um dado importante a ser discutido relaciona-se à questão da expressão ectópica, ou seja, quando se usam promotores de expressão de glândula mamária, espera-se que a expressão dos genes de interesse se dê nessas células (Palmer *et al.*, 2003). No entanto, quando se empregam promotores de espécies diferentes, mesmo sendo para o mesmo gene, bem como moléculas de cDNA, parece que certos fatores de transcrição e a presença de seqüências nos íntrons influenciam, de certa forma, à expressão. Estudos têm demonstrado que muitos desses problemas podem ser superados com a utilização de cromossomos artificiais (Duch *et al.*, 2004; Epinat *et al.*, 2003).

Resumidamente, a produção de proteínas no leite é limitada por uma série de fatores: i) presença de proteínas líticas que hidrolisam as proteínas heterólogas de interesse; ii) alto custo para gerar e manter vacas, cabras e ovelhas transgênicas; iii) alto custo de purificação protéica do leite em função do número elevado de

proteínas; bem como risco de transmissão de partículas virais presente em enfermidades compartilhadas entre mamíferos. Neste sentido, outros fluidos biológicos têm sido revisados como potencial uso como biorreator (Houdebine, 2005; Kues e Niemann, 2004; Niemann *et al.*, 2005).

Urina

A expressão de proteínas na urina surge como uma alternativa interessante, visto que proteínas produzidas neste sistema poderiam ser coletadas logo após o nascimento, de ambos os sexos e durante toda a vida do animal transgênico (Zhu *et al.*, 2003). A baixa concentração de proteínas e lipídeos presentes na urina facilita o processo de purificação. Trabalhos recentes têm demonstrado o direcionamento da expressão para os rins e para a bexiga, produzindo uma variada gama de proteínas recombinantes humanas como: eritropoietina (Kwon *et al.*, 2006; Zbikowska *et al.*, 2002), α_1 -antitripsina (Zbikowska *et al.*, 2002), hormônio do crescimento (Zhu *et al.*, 2003), fator de necrose tumoral (TNF- α) (Zhu *et al.*, 2004) e fator estimulante de macrófagos (Kim *et al.*, 2006; Ryoo *et al.*, 2001).

Kerr *et al.* (1998) determinaram o direcionamento da expressão gênica do hormônio do crescimento humano pelo promotor *uroplakin II*, ao urotélio da bexiga de camundongos. Foi possível detectar na urina desses animais até 500ng/ml de hormônio do crescimento humano, permanecendo constantes por oito meses. Um pequeno rebanho de gado com 200 animais transgênicos, em que cada um produza aproximadamente 20 litros por dia de urina, com 0,5mg/ml de proteína recombinante, poderia produzir aproximadamente 300 gramas em 1 ano. O *uroplakin* é um gene expresso exclusivamente no epitélio da bexiga. Isso permite utilizar o promotor desses genes, *uroplakin II*, e fusionar a ele genes de interesse que possam ser produzidos em bexigas de animais maiores como vacas (Zhu *et al.*, 2004).

Em outro estudo, também com camundongos transgênicos, foi possível expressar fatores estimulantes de granulócitos humanos (hGM-CSF), na urina, por meio do promotor *uroplakin II*. Foram constatadas expressões gênicas não só no urotélio da bexiga, como também nos ureteres dos animais. A concentração detectada foi de até 180ng/ml do hGM-CSF e ainda com proliferação de monócitos, determinando com que a proteína recombinante estivesse bioativa. Essa, sem dúvida, foi a primeira demonstração de atividade biológica ativa produzida na urina de um indivíduo transgênico (Kim *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2006; Ryoo *et al.*, 2001).

A uromodulina é a proteína mais abundante encontrada na urina de mamíferos. Na tentativa de utilizar o promotor do gene dessa proteína, foram desenvolvidos alguns trabalhos para dirigir a expressão ao tecido alvo. Tal proteína é produzida e liberada até 200mg/dia na urina de mamíferos placentários. O promotor GUM, um fragmento clonado do promotor do gene da uromodulina de cabras, dirigiu a expressão do gene repórter GFP aos rins de camundongos transgênicos e com excreção eventual na urina das proteínas recombinantes. No entanto, para o sistema biológico ser atrativo a aplicações comerciais, os níveis de expressão devem estar entre 0.5 a 1 g/l de urina. Secreções de 65 μ g/ml de alfa 1-antitripsina em urinas de camundongos foram alcançadas, utilizando o promotor humano da uromodulina (Huang *et al.*, 2005).

A produção de proteínas recombinantes em sistema urinário promove um grande avanço na questão de geração de animais transgênicos como modelos biológicos de biorreatores, mas alguns fatores, desconhecidos até o momento, limitam essa produção em larga escala. No entanto, algumas vantagens podem ser destacadas como: presença de pouca quantidade de lipídeos e proteínas; alta produção diária do fluido biológico; eliminação voluntária; além disso, a coleta do material não necessariamente é invasiva; há facilidade de purificação das proteínas recombinantes; o animal transgênico, neste modelo, poderia ser usado ao longo de toda sua vida como biorreator animal desde o nascimento (Foubister, 2004).

Plasma seminal

O plasma seminal também tem sido considerado um local em potencial para secreção de proteínas recombinantes em animais transgênicos. O sêmen é um abundante fluido biológico em algumas espécies; além disso, de um modo geral, tem-se facilidade na obtenção dele. O interesse na obtenção de proteínas recombinantes a partir do plasma seminal provém de alguns pontos como, por exemplo: grande capacidade de produção de proteínas sendo contínua por toda a vida do animal; bem como pela eficiência no processo de modificações pós traducionais das proteínas recombinantes (Houdebine, 2002b).

De forma geral, o sêmen suíno, por exemplo, apresenta 30mg de proteína por ml de sêmen; já o ejaculado de reprodutores dessa espécie pode produzir 200-300 ml de sêmen em média, produzindo um total de 6-9g de proteína por ejaculação. Outro ponto interessante é que a secreção nesses tecidos é exclusivamente exócrina, minimizando o risco da atividade biológica da proteína recombinante em ser prejudicial ao hospedeiro; isso pode ocorrer em outros modelos de biorreatores como na urina de animais geneticamente modificados (Houdebine, 2005).

Sob outro aspecto, a geração de animais transgênicos, como biorreatores, produzindo proteínas recombinantes no sêmen, pode apresentar algumas limitações devido ao conhecimento científico a respeito de seqüências regulatórias e promotores que dirigem a expressão para as glândulas sexuais masculinas ser ainda

limitado. Conseqüentemente, o isolamento e a caracterização dessas proteínas são oportunos, a fim de determinar os genes que estão sendo expressos naturalmente nos tecidos sexuais masculinos. Um número limitado de trabalhos científicos tem sido descrito nessa linha de investigação, por outro lado, há um vasto campo a ser explorado para dirigir a expressão gênica exógena e estabelecer esse modelo de biorreação interessante. Um modelo bastante pertinente é o plasma seminal de peixes.

O modelo mais estudado até o momento, sobre produção de proteínas em plasma seminal é o suíno. O trabalho inédito, publicado na revista *Nature*, em 1999, pelo grupo canadense do renomado pesquisador Dr. François Pothier, demonstrou claramente a produção de suínos transgênicos que expressavam, no sêmen, o hormônio do crescimento humano (hGH). O grande ganho científico de tal experimento foi demonstrado pela utilização do promotor específico do gene P12 de camundongos fusionado ao gene hGH, dirigindo a expressão para vesícula seminal de suínos. As concentrações obtidas de hGH foram de 0.5mg/ml de sêmen (Dyck *et al.*, 1999). A produção de tal concentração protéica exógena foi imediatamente atrativa à indústria farmacêutica (Dyck *et al.*, 2003). No entanto, a manutenção dos animais reprodutores geneticamente modificados ainda elevaria o custo do produto final. A fim de promover novas estratégias de direcionamento da expressão gênica, novos modelos e tecidos têm sido estudados. Nosso grupo vem trabalhando para dirigir a expressão às células de Sertoli por meio de diversos promotores sintéticos.

O isolamento e a caracterização das proteínas CRISP no final da década de 90 promoveram uma interessante estratégia de direcionamento a ejaculados de mamíferos, no entanto essas publicações passaram despercebidas (Schwidetzky *et al.*, 1997). Essas proteínas, produzidas por células do epidídimo de camundongos denominadas de CRISP-1 (cysteine-rich secretory protein-1) voltaram a ser alvo de estudo de seus promotores gênicos com a finalidade de direcionamento da expressão gênica ao sêmen (Klemme *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001; 2006).

Outro ponto significativo a ser considerado refere-se ao processo de purificação do produto de interesse, que parece ser menos complexo do que os aplicados a outros fluidos como leite e ovos de aves. Os processos de purificação apresentam a tendência de evoluírem juntamente com as demais técnicas de biologia molecular, não sendo um problema a longo prazo. No entanto, características celulares intrínsecas aos tecidos candidatos a biorreatores, como habilidade de executar modificações pós-traducionais, são fundamentais na eleição dos modelos biológicos de expressão de proteínas recombinantes de alto valor biológico (Gabril *et al.*, 2002; Scieglinska *et al.*, 2004).

Sangue

A possibilidade de isolamento de proteínas recombinantes em sangue de suínos transgênicos tem sido explorada com a proposta de produzir hemoglobina humana nesses animais (Janne *et al.*, 1994). A proximidade morfofisiológica, entre a espécie humana e suína, permite que manipulações genéticas na espécie suína tenham significativas contribuições à biomedicina. Todavia, o sangue não tem demonstrado ser um bom modelo de fluido corporal para produção de proteínas recombinantes bioativas, devido ao efeito negativo e invasivo que essas moléculas podem causar à saúde do modelo biológico utilizado (Lubon *et al.*, 1996).

O soro, o qual coleta secreções de diversos tecidos, pode ser uma fonte interessante de proteínas recombinantes. A alfa-1-antitripsina humana, por exemplo, é uma glicoproteína de 52 kDa produzida principalmente pelos hepatócitos e tem sido obtida em altos níveis, a partir de soro de coelhos transgênicos. Uma limitação observada, nesse caso, é a dificuldade de purificação da proteína recombinante e separação das demais proteínas endógenas presentes no fluido. A substituição de genes endógenos por genes humanos, através da recombinação homóloga, tem sido sugerida para solucionar esse problema. Anticorpos recombinantes foram também detectados em sangue de suínos e coelhos geneticamente modificados. Porém, esses estavam presentes em baixa concentração e hibridizados a cadeias de anticorpos endógenos (Houdebine, 2000; Houdebine, 2002a).

Na realidade, o fluido sangüíneo apresenta uma complexidade biológica muito significativa. Diversos componentes sangüíneos, principalmente protéicos, sofrem mudanças conformacionais e funcionais já no tecido sangüíneo, o que torna esse ambiente muito adverso à produção de proteínas recombinantes. Entretanto, já foi demonstrado ser possível produzir proteínas recombinantes nesse fluido importante a todos os demais sistemas do organismo (Niemann *et al.*, 2005).

Clara de ovos de aves domésticas

A clara do ovo contém 60% de albumina, sendo que deste percentual 88% é água e 11% são proteínas. A albumina é bioquimicamente simples, as principais proteínas presentes em 60g de albumina são a ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucoide e a lisozima, que são as mais abundantes (54%, 12%, 12% e 3,4% respectivamente) (Lillico *et al.*, 2005).

Os ovos de galinhas contêm cerca de 4 gramas de proteínas, sendo mais da metade produzida pelo gene da albumina; Neste sentido, a região promotora do gene da ovoalbumina é de grande interesse para o direcionamento da produção de biofármacos recombinantes (Harvey *et al.*, 2002; Harvey e Ivarie, 2003; Ivarie,

2003; 2006).

A produção de proteínas farmacêuticas em ovos pode ter vantagens significativas para o direcionamento específico de drogas, incluindo uma apropriada maquinaria para a glicosilação, baixo custo quando comparado à cultura de células ou sistemas de mamíferos transgênicos em larga escala, e o ovo é um ambiente estéril. A produção de proteínas humanas, a partir de galinhas, pode ser o método de escolha para algumas proteínas que são tóxicas para os mamíferos (Harvey *et al.*, 2002).

Esforços para o desenvolvimento de modificações genéticas em aves têm sido dirigidos não só pela importância das aves, bem como para um modelo de estudo do desenvolvimento destes vertebrados, e ainda mais pela intrigante possibilidade da produção de proteínas terapêuticas humanas nos ovos de aves transgênicas (Lillico *et al.*, 2005). Desenvolver aves geneticamente modificadas biorreatoras possibilita a diminuição dos riscos de veiculação de patógenos inter-específicos, devido a sua grande distância filogenética em relação aos humanos (Ivarie, 2003). Outra grande vantagem do uso de ovos de aves para a produção de drogas proteicas é a semelhança entre o padrão de glicosilação das proteínas de aves e de humanos, visto que alguns pacientes desenvolvem anticorpos contra epítomos de açúcares exógenos de drogas manufaturadas em outros animais transgênicos. O modelo biológico aves promete um baixo custo para a alta produção de biofármacos humanos por meio dos ovos modificados por engenharia genética (Ivarie, 2006).

A geração de aves transgênicas permanece como uma tarefa difícil, cujo sucesso é ainda limitado. Salienta-se que a microinjeção de genes isolados na célula embrionária, pelo desenvolvimento *in vitro* representa uma possibilidade. Por sua vez, o uso de células ES, para gerar aves quiméricas, evidencia-se um método com elevado potencial. O interesse desses protocolos ainda permanece limitado em razão de os genes exógenos não serem transmitidos para a progênie na maior parte dos casos descritos (Etches, 2001; Etches *et al.*, 1993). Vetores retrovirais têm sido muito estudados. Quando injetados perto de células germinais primordiais de embriões de galinhas em desenvolvimento, tais elementos são integrados no genoma, e os genes exógenos são encontrados na progênie. Essas ferramentas recentes têm conduzido à produção de proteínas exógenas em ovo branco de galinhas transgênicas. Considerando que uma única galinha pode produzir 330 ovos por ano, e cada ovo branco apresenta, naturalmente, 4g de proteína, tal fenômeno tornaria esse sistema altamente competitivo (Mozdziak *et al.*, 2003; Perry e Sang, 1993) (Mozdziak e Petitte, 2004).

Os promotores gênicos ovoalbumina, ovomucóide e ovotransferrina têm sido alvo de nosso grupo em estudos de direcionamento para produção de proteínas em claras de ovos. Sequências regulatórias do gene da lisosima parecem mediar a secreção de proteínas exógenas neste biorreator (Lampard e Gibbins, 2002).

Várias metodologias vêm sendo utilizadas para acessar e manipular o genoma de aves em diferentes estágios do desenvolvimento. Um destes métodos é o uso de espermatozoides para carrear os genes para dentro do ovo no momento da fertilização, por meio da SMGT, com a possibilidade de posterior integração do mesmo no genoma do embrião (Hasebe *et al.*, 1998). Esse método é uma alternativa muito atraente, visto que evitaria manipulações mais complexas. Nessa técnica, uma construção de DNA é ligada aos espermatozoides, e o sêmen é usado para inseminar uma fêmea fértil em pico de postura. O espermatozoide, que fertiliza o ovo com sucesso, carrega o transgene de interesse para dentro do ovo, e este incorpora-se ao embrião e às aves nascidas. Neste aspecto, a ave doméstica é uma candidata ideal para a produção eficiente de proteínas terapêuticas devido aos seguintes fatores: i) o custo para alimentar uma galinha é mais baixo quando comparado à alimentação de outros animais domésticos; ii) o ambiente do ovo é naturalmente estéril (o que permite uma vida longa da proteína recombinante sem que haja perda da atividade); iii) uma grande quantidade de proteína pode ser produzida por ovo (50mg ou mais); e iv) um grande número de ovos é produzido por fêmea por ano (mais de 300 ovos por fêmea/ano) (Mozdziak e Petitte, 2004).

Embriões e ovos de peixes

Embriões de peixes têm apresentado notáveis vantagens como modelos de biorreatores, quando comparados com outros modelos de animais domésticos transgênicos. Os produtos recombinantes derivados de ovos e embriões de peixes promovem mais segurança em questões de saúde humana, pois até o momento não foram descritos potenciais patógenos que desencadeassem zoonoses significativas em humanos (Hwang *et al.*, 2004).

Esse sistema de expressão de proteínas apresenta diversas vantagens: i) proteínas podem ser produzidas de forma rápida e com baixo custo; ii) fácil manutenção dos estoques; iii) podem ser sintetizadas proteínas recombinantes a baixas temperaturas; iv) produção em larga escala dos animais geneticamente modificados por meio de SMGT - *Sperm Mediated Gene Transfer*; (Collares *et al.*, 2005) v) a transmissão de vírus e *prions*, não ser conhecido até o momento, entre peixes e humanos; vi) a maquinaria celular disponível ao complexo protéico recombinante sofrer modificações pos-traducionais (PTMs).

O grupo japonês de pesquisa, coordenado pelo Dr. Goro Yoshizaki, tem demonstrado a produção de gflH (*goldfish luteinizing hormone*), utilizando, como biorreatores, embriões de trutas com quatro dias de idade. O vetor de expressão contendo o cDNA de gflH foi microinjetado em ovos de truta arco-íris e, após quatro dias de incubação a 10 °C, foram selecionados os embriões transgênicos e obtida a proteína recombinante glicosilada. A proteína purificada foi capaz de estimular a produção de testosterona em fragmentos testiculares de goldfish,

em ensaios de atividade biológica. Esse estudo foi o primeiro a demonstrar a produção, com sucesso, de gonadotrofinas recombinantes biotivas em peixes ciprinídeos (Morita *et al.*, 2004). Os resultados desse grupo de pesquisa demonstraram que embriões de trutas apresentam potencial como biorreatores na produção de proteínas recombinantes funcionais. É importante destacar que não só o hormônio luteinizante (LH), como uma variedade de proteínas de interesse terapêutico, poderia ser produzida por esse sistema. Sem dúvida, um caminho alternativo parece ter sido traçado.

Outro grupo de destaque, coordenado pelo Dr. Norman Maclean, da Universidade de Southampton, UK, tem demonstrado, em diversos trabalhos na linha de transgênese de peixes, possibilidades surpreendentes de modificações genéticas. Em um de seus trabalhos mais recentes, demonstrou a expressão do fator VII da coagulação sanguínea humana em ovas de três espécies de peixes (*Clarias gariepinus*, *Oreochromis niloticus* e *Danio rerio*). Nos ovos, foram microinjetadas construções circulares, contendo o promotor do CMV (citomegalovírus) fusionado ao gene FVII. Esse grupo demonstrou a possibilidade de expressar proteínas de interesse biofarmacêutico em ovas fertilizadas e não fertilizadas, bem como em estágios mais avançados do desenvolvimento, como em embriões e em larvas de peixes. Pode ser destacado que cerca de 1800 ovos de tilápias microinjetados podem produzir 4.5 mg do FVII da coagulação recombinante (Hwang *et al.*, 2004). Esses resultados demonstram que peixes podem ser ferramentas interessantes, como modelo biológico de biorreator, para produção de proteínas terapêuticas humanas recombinantes, por meio da transgenia animal.

Ambos os grupos de trabalho demonstraram alternativas do modelo de biorreator, tanto para aquicultura, por meio da produção de LH, para indução do desenvolvimento gonadal, como para biomedicina, pela produção de fatores da coagulação importantes no tratamento das hemofilias. Os animais transgênicos foram gerados a partir de microinjeção em embriões.

Custo de produção de animais transgênicos como biorreatores

O custo de produção de um animal gerado por técnicas de biologia molecular e reprodução animal avançada são muito relativos, e ainda, as informações disponíveis provêm de laboratórios de pesquisas e de empresas que não estão à vontade em divulgar seus custos de produção. No entanto, alguns dados disponíveis são extremamente interessantes.

O tempo de fabricação do produto final, somado ao custo capital e de produção estão a favor dos animais transgênicos, em relação ao cultivo de células de mamíferos geneticamente modificadas. Por exemplo, se fosse construir um biorreator baseado em células de mamíferos, para produção de 10.000 litros de uma determinada proteína, fabricada com facilidade por estas células, levar-se-iam de três a cinco, anos e o custo seria de 250 a 500 milhões de dólares. Uma fazenda modelo destinada à produção de animais transgênicos, como biorreatores para mesma produção em leite, depende da proteína de interesse, apresenta um custo geral de 80 milhões de dólares, levando em consideração os processos de purificação protéica. Para produção de 50kg de uma proteína genérica, tem-se o custo de US\$942/g em cultivo de células de mamíferos. Já, em modelos de biorreatores animal como no leite, por exemplo, esse custo é de US\$700/g (Houdebine, 2000; Niemann *et al.*, 2005; Niemann e Kues, 2000; Niemann e Kues, 2003; Wall, 1999).

Salienta-se que a rápida expansão e o crescimento da biotecnologia, nos recentes anos, proporcionaram a expressão de uma variada gama de proteínas em diferentes sistemas biológicos de produção, dirigida à saúde humana. Uma linha importante a ser considerada é a produção de hemoderivados: fatores da coagulação humana; eritropoetina e antitrombina III. Se considerar a produção desses fatores sanguíneos, bem como a de outras proteínas complexas bioativas, em sistemas de biorreatores animais (leite, sêmen, urina e clara de ovos) poder-se-ia um avanço significativo nos processos de produção em larga escala, com custos menores e, conseqüentemente, valores menores ao produto final comercializado.

Aplicações comerciais dos animais transgênicos biorreatores

As primeiras fazendas farmacêuticas de animais transgênicos, como biorreatores, foram estabelecidas por empresas biotecnológicas como *Pharmaceutical Proteins Ltd* (PPL) na Escócia; *Genzyme Transgenics*, nos Estados Unidos; *Gene Pharming Europe*, na Holanda; *Bioprotein*, na França; *Nexia Biotechnologies*, no Canadá, entre outras (Houdebine, 2005; Niemann *et al.*, 2005). Sem dúvida, no final da década de 90, foi observada uma tendência à formação de diversas empresas no ramo da engenharia genética animal e biotecnologia avançada. Muitas delas acabaram fundindo-se e criando mega empresas no setor de produção de fármacos. Outras, já grandes, durante esse processo criaram empresas apêndices para realizar ensaios biológicos e prospecção futura da viabilidade do negócio.

Enfatiza-se que os investimentos no setor biotecnológico crescem a cada ano. Uma variedade de espécies, como vacas, cabras, porcas, ovelhas, camundongas, coelhas e galinhas transgênicos, estão sendo utilizadas em ensaios biotecnológicos para produção de fármacos recombinantes por 20 empresas no mundo. Estimam-se cifras ao redor de 13 bilhões de dólares por ano investidos no setor, sendo 1 bilhão apenas na produção de anticorpos humanizados (Houdebine, 2002b; Wheeler *et al.*, 2003).

Considerando a vasta gama de proteínas possíveis de serem expressas em sistemas de biorreatores animal, com custos significativamente mais baixos, criou-se uma corrida na busca de novas ferramentas moleculares de produção e purificação protéica. Novos modelos biológicos, como peixes e aves, vêm sendo considerados como biorreatores em potencial e, por conseqüência, o mercado já responde com abertura de grupos de pesquisa e empresas dispostos a estudar essa viabilidade.

Por sua vez o domínio de novas técnicas em biologia molecular e reprodução animal tem determinado mudanças genéticas significativas em nível molecular, resultando em uma revolução na biologia moderna. Inclusive, o sucesso em modificar a maquinaria gênica de organismos vivos por meio da engenharia genética promoverá a reflexão em relação a vários conceitos e a estratégias a serem definidas em terapias futuras. A habilidade dos animais transgênicos gerados em produzir proteínas recombinantes, biologicamente ativas, de uma maneira eficiente e econômica, estimulou muito o interesse nessa área, tendo uma influência crescente em saúde humana e animal, bem como em setores de produção de fármacos.

A produção de animais transgênicos, como biorreatores, evidencia-se como um processo ainda incômodo e problemático na consolidação dessa tecnologia, visto que a transgenia apresenta-se como uma área necessariamente multidisciplinar, habilitando diversos campos das ciências da vida, como biologia celular, biologia molecular, histoquímica, bioquímica, fisiologia, embriologia, genética e reprodução animal.

Irrefutavelmente, verifica-se que os modelos animais gerados por engenharia genética animal destinados à produção de fármacos de elevado valor biológico, chamados de biorreatores animal, têm demonstrado ser uma alternativa potencial, mais econômica e produtiva, comparado aos sistemas de fermentação e cultivo celulares.

Constata-se que ensaios pré-clínicos e clínicos devem ser constantemente realizados até o estabelecimento dos novos produtos. A questão da biossegurança e a da bioética não podem ser descuidadas, devendo sempre ser consideradas no setor de pesquisa e produção. O estudo dos mecanismos que dirigem a expressão gênica aos tecidos candidatos a biorreatores deve merecer maiores atenções pela pesquisa, visto que parece ser a chave de grande parte do sucesso desta linha.

Por fim, o controle total da expressão gênica e a produção de proteínas recombinantes em animais transgênicos continuarão avançando, e os produtos gerados serão constantemente avaliados quanto à sua segurança e eficiência.

Referências

- Andersen DC, Krummen L.** Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*, v.13, p.117-123, 2002.
- Arima T, Ebara F, Fujihara N.** Intra-testicular injection of foreign DNA as a possible method for the production of transgenic chicken. *J Appl Anim Res*, v.20, p.65-72, 2001.
- 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.
- Baldassarre H, Wang B, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN.** State of the art in the production of transgenic goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.465-470, 2004.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G.** Gene regulation - Insulators and boundaries: Versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science*, v.291, p.447-450, 2001.
- Beraldi R, Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Spadafora C.** Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.279-287, 2006.
- Bodrogi L, Brands R, Raaben W, Seinen W, Baranyi M, Fiechter D, Bosze Z.** High level expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res*, v.15, p.627-636, 2006.
- Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, Bilodeau AS, Pontes JHF, 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.
- Caelers A, Maclean N, Hwang GL, Eppler E, Reinecke M.** Expression of endogenous and exogenous growth hormone (GH) messenger (m) RNA in a GH-transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res*, v.14, p.95-104, 2005.
- Carballada R, Esponda P.** Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. *Exp Cell Res*, v.262, p.104-113, 2001.
- Celebi C, Guillaudoux T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V, Jegou B.** The making of "transgenic spermatozoa". *Biol Reprod*, v.68, p.1477-1483, 2003.
- Chang K, Qian J, Jiang M, Liu YH, Wu MC, Chen CD, Lai CK, Lo HL, Hsiao CT, Brown L, Bolen J, Jr., Huang HI, Ho PY, Shih PY, Yao CW, Lin WJ, Chen CH, Wu FY, Lin YJ, Xu J, Wang K.** Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol*, v.2, p.5, 2002.
- Collares T, Bongalhardo DC, Deschamps JC, Moreira HLM.** Transgenic animals: The melding of molecular

- biology and animal reproduction. *Anim Reprod*, v.2, p.11-27, 2005.
- Duch M, Carrasco ML, Jespersen T, Hansen BD, Pedersen FS.** Transgene stability for three replication-competent murine leukemia virus vectors. *Gene*, v.329, p.61-69, 2004.
- Dunn DA, Kooyman DL, Pinkert CA.** Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Disc Today*, v.10, p.757-767, 2005.
- Dupuy AJ, Clark K, Carlson CM, Fritz S, Davidson AE, Markley KM, Finley K, Fletcher CF, Ekker SC, Hackett PB, Horn S, Largaespada DA.** Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.4495-4499, 2002.
- Dyck MK, Gagne D, Ouellet M, Senechal JF, Belanger E, Lacroix D, Sirard MA, Pothier F.** Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat Biotechnol*, v.17, p.1087-1090, 1999.
- Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA.** Making recombinant proteins in animals - different systems, different applications. *Trends Biotechnol*, v.21, p.394-399, 2003.
- Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, Patin A, Zanghellini A, Paques F, Lacroix E.** A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, v.31, p.2952-2962, 2003.
- Etches RJ.** From chicken coops to genome maps: Generating phenotype from the molecular blueprint. *Poult Sci*, v.80, p.1657-1661, 2001.
- Etches RJ, Carsience RS, Clark ME, Fraser RA, Toner A, Gibbins AMV.** Chimeric Chickens and Their Use in Manipulation of the Chicken Genome. *Poult Sci*, v.72, p.882-889, 1993.
- Ewerling S, Hofmann A, Klose R, Weppert M, Brem G, Rink K, Pfeifer A, Wolf E.** Evaluation of laser-assisted lentiviral transgenesis in bovine. *Transgenic Res*, v.15, p.447-454, 2006.
- Fan JL, Watanabe T.** Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther*, v.99, p.261-282, 2003.
- Foubister V.** A 'bioreactor' for bladder cancer cells. *Drug Disc Today*, v.9, p.946-947, 2004.
- Gabril MY, Onita T, Ji PG, Sakai H, Chan FL, Koropatnick J, Chin J, Moussa M, Xuan JW.** Prostate targeting: PSP94 gene promoter/enhancer region directed prostate tissue-specific expression in a transgenic mouse prostate cancer model. *Gene Ther*, v.9, p.1589-1599, 2002.
- Giordano R, Magnano AR, Zaccagnini G, Pittoggi C, Moscufo N, Lorenzini R, Spadafora C.** Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *J Cell Biol*, v.148, p.1107-1113, 2000.
- Giraldo P, Montoliu L.** Size matters: Use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res*, v.10, p.83-103, 2001.
- Gordon JW, Ruddle FH.** Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected Into Mouse Pronuclei. *Science*, v.214, p.1244-1246, 1981.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH.** Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.77, p.7380-7384, 1980.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL.** Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection. *Nature*, v.315, p.680-683, 1985.
- Harvey AJ, Ivarie R.** Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poult Sci*, v.82, p.927-930, 2003.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R.** Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature Biotechnol*, v.20, p.396-399, 2002.
- Hasebe M, Soh T, Hattori M, Fujihara N.** An attempt to produce transgenic chicken mediating sperm cells as vectors. *J Appl Anim Res*, v.14, p.143-150, 1998.
- Hibbitt O, Coward K, Kubota H, Prathalingham N, Holt W, Kohri K, Parrington J.** In vivo gene transfer by electroporation allows expression of a fluorescent transgene in hamster testis and epididymal sperm and has no adverse effects upon testicular integrity or sperm quality. *Biol Reprod*, v.74, p.95-101, 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.** Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr Opin Biotechnol*, v.13, p.625-629, 2002a.
- Houdebine LM.** The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol*, v.98, p.145-160, 2002b.
- Houdebine LM.** Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*, v.9, p.305-320, 2000.
- Houdebine LM.** Preparation of recombinant proteins in milk. *Meth Mol Biol*, v.267, p.485-494, 2004.
- Houdebine LM.** Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.269-281, 2005.
- Houdebine LM, Rival S, Pantano T, Jolivet G, Thepot D, Attal J.** Transgenesis for the study and the control of lactation. *Reprod Nutr Dev*, v.42, p.117-125, 2002.
- Huang YJ, Chretien N, Bilodeau AS, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN.** Goat uromodulin promoter directs

- kidney-specific expression of GFP gene in transgenic mice. *BMC Biotechnol*, v.5, 2005.
- Hwang GL, Muller F, Rahman MA, Williams DW, Murdock PJ, Pasi KJ, Goldspink G, Farahmand H, Maclean N.** Fish as bioreactors: Transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Marine Biotechnol*, v.6, p.485-492, 2004.
- Hyvonen P, Suojala L, Haaranen J, von WA, Pyorala S.** Human and bovine lactoferrins in the milk of recombinant human lactoferrin-transgenic dairy cows during lactation. *Biotechnol J*, v.1, p.410-412, 2006a.
- Hyvonen P, Suojala L, Orro T, Haaranen J, Simola O, Rontved C, Pyorala S.** Transgenic cows that produce recombinant human lactoferrin in milk are not protected from experimental *Escherichia coli* intramammary infection. *Infect Immun*, v.74, p.6206-6212, 2006b.
- Ivarie R.** Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol*, v.21, p.14-19, 2003.
- Ivarie R.** Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol*, v.24, p.99-101, 2006.
- Janne J, Hyttinen JM, Peura T, Tolvanen M, Alhonen L, Sinervirta R, Halmekyto M.** Transgenic Bioreactors. *Int J Biochem*, v.26, p.859-870, 1994.
- Keefer CL.** Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.5-12, 2004.
- Kerr DE, Liang FX, Bondioli KR, Zhao HP, Kreibich G, Wall RJ, Sun TT.** The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol*, v.16, p.75-79, 1998.
- Kim MO, Kim SH, Lee SR, Kim KS, Min KS, Lee HT, Kim SJ, Ryoo ZY.** Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) into mouse urine. *Life Sci*, v.78, p.1003-1009, 2006.
- Klemme LM, Roberts KP, Hoffman LB, Ensrud KM, Siiteri JE, Hamilton DW.** Cloning and characterization of the rat Crisp-1 gene. *Gene*, v.240, p.279-288, 1999.
- Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Lee HT, Choi HJ, Kim JH, Kim NH, Jeon I, Chang W, Kim T.** Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Mol Reprod Dev*, v.68, p.429-434, 2004.
- Kos CH.** Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev*, v.62, p.243-246, 2004.
- Kues WA, Niemann H.** The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol*, v.22, p.286-294, 2004.
- Kwon DN, Choi YJ, Park JY, Cho SK, Kim MO, Lee HT, Kim JH.** Cloning and molecular dissection of the 8.8 kb pig uroplakin II promoter using transgenic mice and RT4 cells. *J Cell Biochem*, v.99, p.462-477, 2006.
- Lai LX, Prather RS.** Progress in producing knockout models for xenotransplantation by nuclear transfer. *Ann Med*, v.34, p.501-506, 2002.
- Lampard GR, Gibbins AMV.** Secretion of foreign proteins mediated by chicken lysozyme gene regulatory sequences. *Biochem Cell Biol*, v.80, p.777-788, 2002.
- Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A.** Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.19-23, 2006.
- 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.
- Lavitrano M, Maione B, Forte E, Francolini M, Sperandio S, Testi R, Spadafora C.** The interaction of sperm cells with exogenous DNA: A role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Exp Cell Res*, v.233, p.56-62, 1997.
- Li L, Shen W, Min LJ, Dong HS, Sun YJ, Pan QJ.** Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.689-695, 2006.
- Lillico SG, McGrew M, Sherman A, Sang HM.** Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Disc Today*, v.10, p.191-196, 2005.
- Lindsay M, Gil GC, Cadiz A, Velandar WH, Zhang CM, Van Cott KE.** Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. *J Chromatogr A*, v.1026, p.149-157, 2004.
- Lubon H, Paleyanda RK, Velandar WH, Drohan WN.** Blood proteins from transgenic animal bioreactors. *Transf Med Rev*, v.10, p.131-143, 1996.
- Lunney JK.** Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*, v.3, p.179-184, 2007.
- Magnano AR, Giordano R, Moscufo N, Baccetti B, Spadafora C.** Sperm/DNA interaction: Integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome. *J Reprod Immunol*, v.41, p.187-196, 1998.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, King AJ.** Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*. v.405, p.1066-1069, 2000; *erratum*: v.408, p.120, 2000.
- Mikus T, Maly P, Poplstein M, Landa V, Trefil P, Lidicky J.** Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse. *Folia Biol*, v.47, p.187-195, 2001.
- Mizuarai S, Ono K, Yamaguchi K, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S.** Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector. *Biochem Bioph Res Commun*, v.286, p.456-463, 2001.
- Montoliu L, Larue L, Beermann F.** On the use of regulatory regions from pigmentary genes to drive the expression of transgenes in mice. *Pigment Cell Res*, v.17, p.188-190, 2004.
- Morita T, Yoshizaki G, Kobayashi M, Watabe S, Takeuchi T.** Fish eggs as bioreactors: the production of

- bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res*, v.13, p.551-557, 2004.
- Mozdziak PE, Borwornpinyo S, McCoy DW, Petite JN.** Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. *Dev Dyn*, v.226, p.439-445, 2003.
- Mozdziak PE, Petite JN.** Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev Dyn*, v.229, p.414-421, 2004.
- Muramatsu T, Shibata O, Ryoki S, Ohmori Y, Okumura J.** Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, v.233, p.45-49, 1997.
- 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.
- Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, Lemme E, Paul D.** Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res*, v.8, p.237-247, 1999.
- Niemann H, Halter R, Espanion G, Wrenzycki C, Herrmann D, Lemme E, Carnwath JW, Paul D.** Expression of human blood clotting factor VIII (FVIII) constructs in the mammary gland of transgenic mice and sheep. *J Anim Breed Gen*, v.113, p.437-444, 1996.
- Niemann H, Kues WA.** Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.291-317, 2003.
- Niemann H, Kues WA.** Transgenic livestock, premises and promises. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.277-293, 2000.
- Niemann H, Kues WA, Carnwath JW.** Transgenic farm animals: present and future. *Rev Sci Tech OIE*, v.24, p.285-298, 2005.
- Palmer CA, Lubon H, McManaman JL.** Transgenic mice expressing recombinant human protein C exhibit defects in lactation and impaired mammary gland development. *Transgenic Res*, v.12, p.283-292, 2003.
- 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. *Nature*, v.300, p.611-615, 1982.
- Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim JH, Lee HT, Chang WK.** Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. *J Biotechnol*, v.122, p.362-371, 2006.
- Perry MM, Sang HM.** Transgenesis in Chickens. *Transgenic Res*, v.2, p.125-133, 1993.
- Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM.** Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Meth*, v.231, p.147-157, 1999.
- Rieth A, Pothier F, Sirard MC.** Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Mol Reprod Dev*, v.57, p.338-345, 2000.
- Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, Nolan MA, Johnston DS, Hamilton DW.** Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Mol Cell Endocrinol*, v.250, p.122-127, 2006.
- Roberts KP, Hoffman LB, Ensrud KM, Hamilton DW.** Expression of Crisp-1 mRNA splice variants in the rat epididymis, and comparative analysis of the rat and mouse Crisp-1 gene regulatory regions. *J Androl*, v.22, p.157-163, 2001.
- Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y.** Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, v.67, p.127-133, 2007.
- Ryoo ZY, Kim MO, Kim KE, Bahk YY, Lee JW, Park SH, Kim JH, Byun SJ, Hwang HY, Youn J, Kim TY.** Expression of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (hGM-CSF) in mouse urine. *Transgenic Res*, v.10, p.193-200, 2001.
- Sato M, Gotoh K, Kimura M.** Sperm-mediated gene transfer by direct injection of foreign DNA into mouse testis. *Transgenics*, v.2, p.357-369, 1999.
- Sato M, Ishikawa A, Kimura M.** Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.49-56, 2002.
- Schwidetzky U, Schleuning WD, Haendler B.** Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1) gene. *Biochem J*, v.321, p.325-332, 1997.
- Sciamanna I, Barberi L, Martire A, Pittoggi C, Beraldi R, Giordano R, Magnano AR, Hodgson C, Spadafora C.** Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information. *Biochem Biophys Res Commun*, v.312, p.1039-1046, 2003.
- Sciamanna I, Piccoli S, Barberi L, Zaccagnini G, Magnano AR, Giordano R, Campedelli P, Hodgson C, Lorenzini R, Spadafora C.** DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, v.56, p.301-305, 2000.
- Scieglińska D, Vydra N, Krawczyk Z, Widlak W.** Location of promoter elements necessary and sufficient to direct testis-specific expression of the Hst70/Hsp70.2 gene. *Biochem J*, v.379, p.739-747, 2004.
- Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y.** Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol Reprod Dev*, v.56, p.306-308, 2000.
- Shen W, Li L, Pan QJ, Min LJ, Dong HS, Deng JX.** Efficient and simple production of transgenic mice and

- rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.589-594, 2006.
- Smith K, Spadafora C.** Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays*, v.27, p.551-562, 2005.
- Spadafora C.** Endogenous reverse transcriptase: a mediator of cell proliferation and differentiation. *Cytogen Genome Res*, v.105, p.346-350, 2004.
- Spadafora C.** Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*, v.20, p.955-964, 1998.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T.** Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol Reprod*, v.67, p.1087-1092, 2002.
- Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K.** Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnol*, v.21, p.52-56, 2003.
- Van Cott KE, Butler SP, Russell CG, Subramanian A, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velander WH.** Transgenic pigs as bioreactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland. *Gen Anal Biomol Eng*, v.15, p.155-160, 1999.
- Van Cott KE, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velander WH.** Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels. *Transgenic Res*, v.10, p.43-51, 2001.
- Wall RJ.** Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. *Liv Prod Sci*, v.59, p.243-255, 1999.
- Wall RJ, Paleyanda RK, Foster JA, Powell A, Rexroad C, Lubon H.** DNA preparation method can influence outcome of transgenic animal experiments. *Anim Biotechnol*, v.11, p.19-32, 2000.
- Wang HJ, Lin AX, Chen YF.** Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. *Anim Biotechnol*, v.14, p.155-165, 2003.
- Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalpra L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, Mc Kenzie IFC, Lavitrano M.** Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.68-76, 2005.
- Wheeler MB, Walters EM, Clark SG.** Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.265-289, 2003.
- Wolf SE, Woodside KJ.** Transgenic and gene knock-out techniques and burn research. *J Surg Res*, v.123, p.328-339, 2005.
- Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, Suzuki M, Takahashi M, Nishihara M.** Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.196-201, 2001.
- Yoshizaki G, Tago Y, Takeuchi Y, Sawatari E, Kobayashi T, Takeuchi T.** Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Biol Reprod*, v.73, p.88-93, 2005.
- Yu Z, Meng Q, Yu H, Fan B, Yu S, Fei J, Wang L, Dai Y, Li N.** Expression and bioactivity of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic mice. *J Dairy Sci*, v.89, p.2911-2918, 2006.
- Zbikowska HM, Soukhareva N, Behnam R, Chang R, Drews R, Lubon H, Hammond D, Soukharev S.** The use of the uromodulin promoter to target production of recombinant proteins into urine of transgenic animals. *Transgenic Res*, v.11, p.425-435, 2002.
- Zhu HJ, Zhang ZQ, Zeng XF, Wei SS, Zhang ZW, Guo YL.** Cloning and analysis of human UroplakinII promoter and its application for gene therapy in bladder cancer. *Cancer Gene Ther*, v.11, p.263-272, 2004.
- Zhu XH, Cheng J, Huang LW, Gao J, Zhang ZT, Pak J, Wu XR.** Renal tubule-specific expression and urinary secretion of human growth hormone: a kidney-based transgenic bioreactor. *Transgenic Res*, v.12, p.155-162, 2003.