



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

TRANSGENIA ANIMAL E SUAS APLICAÇÕES

Whemenson Lennon Gomes de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA- DF
JUNHO/2015



WHEMENSON LENNON GOMES DE OLIVEIRA

TRANSGENIA ANIMAL E SUAS APLICAÇÕES

Monografia apresentada para
conclusão do curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA- DF
JUNHO/2015

De Oliveira, Whemenson Lennon Gomes

Transgenia animal e suas aplicações. / Whemenson Lennon Gomes de Oliveira; orientação do Professor Doutor Ivo Pivato. Brasília-DF, 2015.

44 p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Whemenson Lennon Gomes de Oliveira

Título: Transgenia animal e suas aplicações

Ano: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de especialização pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Whemenson Lennon Gomes de Oliveira

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: DE OLIVEIRA, Whemenson Lennon Gomes

Título: Transgenia animal e suas aplicações

Monografia de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 23/06/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Julgamento: Aprovado

Instituição: UnB

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Julgamento: Aprovado

Instituição: UnB

Assinatura: 

MSc. Paula Lorena Grangeira Souto

Julgamento: Aprovado

Instituição UnB// Embrapa

Assinatura: 

Dedico este trabalho aos meus familiares, professores e amigos, dedico também as pessoas que trabalham com os animais a fim de melhorar a saúde humana respeitando as outras espécies.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe e ao meu falecido pai, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, onde sempre fizeram o máximo por mim, deixando o meu caminho acadêmico e não acadêmico mais livre de obstáculos, fico feliz por não ser submetido a pressão familiar e por ter meu tempo para tomar decisões respeitado.

Ao meu professor, orientador e amigo Ivo Pivato, por me ajudar, por tirar dúvidas, pela paciência, orientações e também pela disposição e animação ao realizar as atividades, é de pessoas assim que a instituição acadêmica precisa.

A todas as pessoas incríveis que conheci durante os cinco anos de curso, agradecimentos especiais a todos meus amigos e amigas da turma 28, obrigado pela ajuda diária, pelas conversas divertidas, pela força nos estudos e por fazerem parte da minha vida, com vocês o tempo certamente passou muito mais rápido.

A todos os professores, pela paciência, disposição e pelos ensinamentos, tudo que aprendi durante os cinco anos devo a vocês.

A todos os demais funcionários e residentes do hospital veterinário de que de certa forma fizeram parte do meu percurso acadêmico.

E por fim agradeço a todos os animais, por nos fornecer alimentação, trabalho e companhia.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	1
2. Revisão De Literatura.....	2
2.1. Transgenia animal.....	2
2.2. Métodos.....	2
2.2.1 Microinjeção pronuclear.....	3
2.2.2. Transferência gênica mediada por retrovírus.....	4
2.2.3. Alteração genética mediada por transposons.....	6
2.2.4. Animais transgênicos a partir de transferência nuclear.....	7
2.2.5. Transferência de gene mediada por espermatozoides.....	9
2.2.6. Transferência de gene mediada por células-tronco embrionárias....	11
2.2.7. Confirmação da integração do DNA exógeno.....	12
2.3. Animais transgênicos em prol da saúde.....	12
2.3.1. Animais transgênicos como biorreatores.....	13
2.3.2. Animais como doadores de órgãos para humanos.....	15
2.4. Aplicação dos animais transgênicos na produção.....	16
3. Conclusão.....	18
4. Referências Bibliográficas.....	19
5. Relatório Final De Estágio Obrigatório.....	32
5.1. Atividades desenvolvidas.....	32
5.2. Considerações Finais.....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Esquema ilustrativo da microinjeção pronuclear.....	4
FIGURA 2 - Injeção do agente viral previamente modificado.....	5
FIGURA 3 – Micromanipulador.....	7
FIGURA 4 - Técnica de transferência nuclear.....	8
FIGURA 5 - SMGT utilizando a incubação de espermatozoides.....	10
FIGURA 6 - Comparação entre o salmão transgênico e o não transgênico.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Célula TE = Célula Tronco-Embrionária

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

EMA = Agência Europeia de Medicamentos

GH = Hormônio do Crescimento

hG-CSF = Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano

IF-1 = Fator inibitório 1

IGF-1 = Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1

PCR = Reação em Cadeia Polimerase

PLDNA = Proteína Ligadora de DNA

RNA = Ácido Ribonucleico

SMGT = transferência de gene mediada por espermatozoide

TN = Transferência Nuclear

RESUMO

TRANSGENIA ANIMAL E SUAS APLICAÇÕES

A produção de animais alterados em laboratório, tem proporcionado a oportunidade de obtenção de ganhos nas mais diversas áreas. Na produção animal, animais transgênicos são capazes de produzir leite com composição modificada, podendo beneficiar várias pessoas, principalmente as intolerantes à lactose e os alérgicos à proteína do leite. Eles podem também produzir mais carne, lã ou leite, além da possibilidade de ter sua resistência a doenças aumentada. Animais modificados também podem ser usados em prol da saúde humana, podendo ser utilizados como biorreatores para produção de proteínas farmacêuticas, como doadores de órgãos para humanos ou até como modelos para estudar doenças humanas como o câncer e o Alzheimer. Atualmente existem vários métodos para se produzir animais transgênicos e independente da metodologia a ser utilizada, três passos básicos fazem parte da maioria das técnicas, sendo eles a aquisição de um embrião ou ovócito da espécie a ser alterada; introdução do gene de interesse dentro do embrião ou do ovócito; e por fim, a transferência dos embriões para as fêmeas receptoras. Para criar animais transgênicos, pode-se optar por qualquer um dos métodos existentes, como a microinjeção pronuclear, a introdução de gene por retrovírus, a transferência de gene mediada por células tronco-embriônicas, além de várias outras.

Palavras-chave: animais transgênicos, biorreatores, produção animal, saúde humana.

ABSTRACT

TRANSGENIC ANIMALS AND THEIR APPLICATIONS

Production of modified animals provided the opportunity to achieve improvement in several fields. In animal production, transgenic animals are able to produce milk with altered composition, benefitting many people, especially those lactose intolerant and allergic to milk protein. They can also produce more meat, wool or milk, in addition to the possibility of to be more resistant to diseases. Modified animals can also be used in support of human health, being employed as bioreactors for pharmaceuticals proteins production, as organ donors to humans or even as models in the study of human diseases, such as cancer and Alzheimer. There are several methods to produce transgenic animals currently, and independent of the methodology chosen, three basic steps are part of most of techniques, being them the acquisition of an embryo or oocyte of the specie chosen to be modified, the introduction of exogenous genetic information inside the embryo or oocyte and finally the introduction of the embryos in recipient females. In order to create transgenic animals, any of the existent methods can be elected, between them pronuclear microinjection, introduction of the gene by retrovirus, gene transference mediated by embryonic stem cells, among several others.

Keywords: animal production, bioreactors, human health, transgenic animals.

1. Introdução

O avanço da tecnologia nos proporcionou a possibilidade de obter melhores resultados nas mais variadas áreas, e a transgenia animal tem se tornado uma ótima opção para aprimorar o uso de indivíduos, através da adição ou remoção de genes. De acordo com a definição original, o animal só é chamado de transgênico quando se comprova que o gene modificado é herdado de forma estável, entretanto, ao usar o termo “animal transgênico” no cotidiano, significa apenas que foi comprovada a presença de um novo gene no indivíduo (BREM et al., 1993).

Em 1975, foi relatada a primeira transgenia animal do mundo, onde embriões de ratos foram infectados com o retrovírus da leucemia, os animais tiveram o material genético do retrovírus incorporado em seu genoma, os roedores também foram capazes de transmitir o novo gene para a geração seguinte (JAENISCH et al., 1975). O primeiro mamífero transgênico que nasceu através da microinjeção pronuclear foi na década de 80 (GORDON et al., 1980; NIEMANN & KUES, 2007), onde se injetou fragmento de DNA com o gene do hormônio de crescimento e a metalotioneína em embrião de ratos, os animais alterados geneticamente apresentavam uma taxa de crescimento bem superior em relação aos animais não modificados (PALMITER et al., 1982).

Na reprodução animal essa mudança genética só é interessante quando o animal é capaz de transferir o novo gene para seus descendentes, de forma que seja possível estabelecer uma linhagem transgênica (BREM et al., 1993).

Já é possível utilizar animais transgênicos para o estudo de diversas doenças humanas como o HIV, Alzheimer e câncer (CAMARA et al., 2008). Os animais modificados também permitem avaliar a eficácia de algumas vacinas e realizar estudos de terapia gênica para o tratamento de doenças genéticas nos humanos. As empresas farmacêuticas possuem grande interesse em animais transgênicos, porque através deles é possível se obter enzimas, anticorpos, hormônios e fatores de crescimento (GIBBONS et al., 2014). Em 2006 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou a comercialização da primeira proteína farmacêutica recombinante, a antitrombina produzida pela glândula mamária de cabras transgênicas (GIBBONS et al., 2014).

A transgenia animal ainda é algo muito recente, e um dos desafios para produzir animais transgênicos é exatamente o alto custo para pesquisa e obtenção de resultados satisfatórios. Outra questão muito polêmica é em relação à ética na experimentação animal que muito se tem falado no século XXI.

O objetivo desta revisão bibliográfica é destacar as técnicas, os pontos positivos e desafios, além de outras informações relevantes referentes à transgenia animal.

2. Revisão De Literatura

2.1. Transgenia animal

Existem varias técnicas para produzir um animal transgênico, entretanto todas elas possuem o mesmo objetivo, que é o de produzir um animal com alguma característica especial de interesse humano. São exemplos de objetivos da transgenia animal: maior conversão alimentar em animais domésticos, resistência a doenças em humanos ou animais, resistência a parasitos, carne de maior qualidade, maior produção de leite, produção de substancias farmacêuticas, produzir animais mais adaptados a um determinado ambiente e transplantes de órgãos (CASTRO, 2001 CAMARA et al., 2008).

2.2. Métodos

O método a ser utilizado vai depender do tipo de alteração genética que se deseja fazer, podendo ser um procedimento de modificação, introdução ou inativação de um gene (PESQUERO et al., 2007; KUMAR et al., 2013). Para se produzir um animal transgênico, é necessário realizar no mínimo três passos essenciais independente da metodologia a ser realizada, sendo eles: a aquisição de um embrião ou ovócito da espécie a ser alterada; introdução da informação genética dentro do embrião ou do ovócito; e por fim a transferência dos embriões para as fêmeas receptoras. Estes três processos fazem parte da maioria das manipulações embrionárias exigidas para se criar um animal transgênico (CASTRO, 2001).

Das técnicas existentes, podemos citar a microinjeção pronuclear, transferência de gene mediada por espermatozoides, infecção de embriões por retrovírus (RIBEIRO & AZEVEDO, 2001; DORFMAN, 2012), transferência de DNA mediada por transposons, agregação ou injeção de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas, transferência de segmentos de cromossomos, entre outras (PESQUERO et al., 2007; AIGNER et al., 2010). A seguir, serão apresentadas as principais técnicas e características dos procedimentos mais utilizados na transgenia animal.

2.2.1. Microinjeção pronuclear

A microinjeção pronuclear foi uma das primeiras técnicas a ser utilizada com sucesso em mamíferos. Inicialmente foi utilizada em ratos, e pouco tempo depois o método foi implementado em outras espécies como coelhos, ovelhas, aves, peixes e suínos (GORDON et al., 1980; GIBBONS et al., 2014). O processo é realizado em um microscópio invertido equipado com micromanipuladores (GADEA & VÁZQUEZ, 2010), onde uma micropipeta contendo segmentos de DNA (aproximadamente 1000 cópias em 1-2 pL) atravessa a zona pelúcida do ovócito fecundado (HOUEBINE, 2003) e é feita a injeção do DNA em um dos pró-núcleos (Figura 1) (CLARK & WHITELAW, 2003; BOVERHOF et al., 2011). O ideal é que a microinjeção pronuclear seja feita entre 15 e 20h após a fecundação, em caprinos deve-se realizar primeiramente a centrifugação dos ovócitos, devido a grande quantidade de gotas lipídicas em seu citoplasma (FREITAS et al., 2014). Depois de injetado o embrião permanece em cultivo *in vitro* até que seja transferido para receptoras sincronizadas (RUMPF & MELO, 2005).

Das vantagens da microinjeção pronuclear, podemos citar a grande probabilidade de transmissão da linhagem germinativa do transgene, um baixo limite no tamanho ou tipo de DNA sintetizado, além de possuir uma relativa estabilidade devido a herdabilidade do gene transgênico (PINKERT, 2004). Por outro lado o método também possui desvantagens, como o custo e o tempo gasto na realização da micromanipulação e a microinjeção, não possui a garantia de integração do DNA exógeno (PINKERT, 2004), a incorporação de genes é

aleatória (GUÉNET et al., 2015) podendo resultar em inserções indesejadas causando mutações. Outra limitação é que embriões em estágio mais avançado do desenvolvimento, não são viáveis para a técnica (GORDON, 1989).

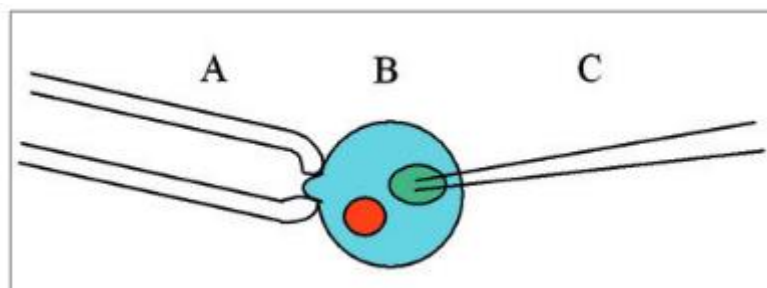


FIGURA 1 – Esquema ilustrativo da microinjeção pronuclear: (A) Pipeta utilizada para estabilizar o embrião. (B) Ovócito fecundado. (C) Pipeta de injeção. (PEÑARANDA & ASENSIO, 2007).

2.2.2. Transferência gênica mediada por retrovírus

Outra forma de obter animais transgênicos é através da introdução de genes por meio de retrovírus. Embriões podem ser infectados com retrovírus até a metade da gestação, entretanto, somente o zigoto no estágio de 4 a 16 células pode ser infectado com um ou mais agentes (PINKERT, 2004). Os retrovírus pertencem à família *Retroviridae*, eles são vírus que possuem RNA como material genético que, após infectar células de mamíferos, convertem seu RNA em DNA no genoma da célula hospedeira por transcrição reversa (SILVA, 2009).

Para alterar um vírus e transformá-lo em um transmissor de material genético exógeno, primeiro deve ser bloqueada sua capacidade de reprodução, eliminando os genes responsáveis por sua replicação, depois deve ser retirada parte do genoma viral para obter espaço suficiente para introduzir o material genético de interesse, retirando os genes que não são essenciais e principalmente aqueles que podem prejudicar o hospedeiro (FERNÁNDEZ, 2008).

Os retrovírus são uma forma eficaz para transferir material genético, sendo utilizados para infectar embriões de bovinos por meio de injeção, que é feita entre a zona pelúcida e a membrana do zigoto (Figura 2), após a fecundação *in vitro*

(CHAN et al., 1998; HOFMANN et al., 2004). O método também pode ser feito expondo os embriões *in vitro* a soluções concentradas de vírus recombinantes (PURSEL & REXROAD, 1993), com o gene de interesse previamente inserido no retrovírus. Depois de infectados os embriões são transferidos para as fêmeas receptoras, assim completando a gestação (PEÑARANDA & ASENSIO, 2007).

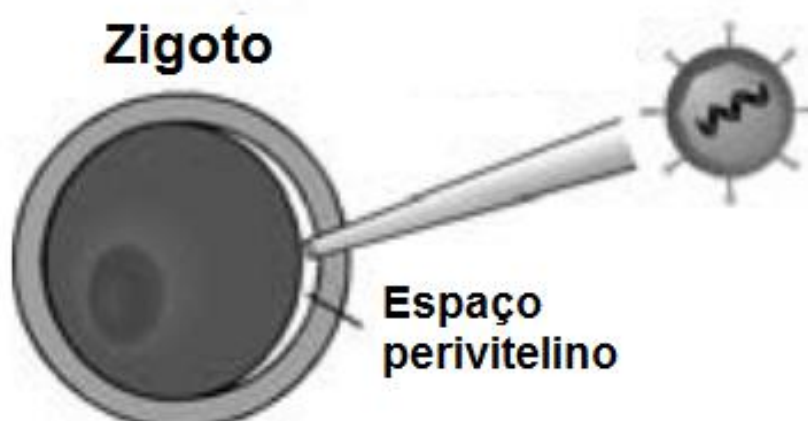


FIGURA 2 – Injeção do agente viral previamente modificado, no espaço entre a zona pelúcida e a membrana do zigoto (espaço perivitelino) (PFEIFER, 2004).

O método apesar de interessante também possui limitações, como o limitado tamanho de material genético carregado pelo retrovírus (HU & PATHAK, 2000). Além disso, somente células em divisão podem ser infectadas (MILLER et al., 1990), sendo que o retrovírus se integra ao DNA do hospedeiro de forma aleatória, podendo causar resultados inesperados (JAHNER & JAENISCH, 1985), como mutações ou morte fetal.

Em animais de produção, a eficiência da transgenia utilizando vetores retrovirais chega a ser 50 vezes superior em relação ao que se consegue através da microinjeção pronuclear (PEÑARANDA & ASENSIO, 2007).

2.2.3. Alteração genética mediada por transposons

Transposons são segmentos de DNA que podem se mover e se multiplicar no genoma de uma célula, fazendo a integração do material genético de forma aleatória (HOUDEBINE, 2009) em um processo chamado de transposição (SILVA, 2009). Existem dois grupos de transposons, os transposons classe I e classe II. Os retrotransposons também conhecidos como transposons classe I, são sequências de DNA que são transcritas em RNA e estas retranscritas em DNA, as cópias geradas se integram em múltiplos sítios do genoma do indivíduo sob ação da enzima transcriptase reversa (BOSCH et al., 2015). O “DNA transposons” ou transposons classe II são sequências de DNA que se movimentam no genoma do hospedeiro por intermédio da enzima transposase, onde cópias do DNA não são geradas (BOSCH et al., 2015). Os transposons foram identificados primeiramente no milho (MCCLINTOCK 1950), pouco tempo depois eles foram detectados no genoma de eucariotos e procariotos (MAKALOWSKI et al., 2012).

Graças a engenharia genética já se pode manipular os transposons fazendo que eles transportem DNA exógeno para incorporar no material genético do futuro animal transgênico. Em vertebrados quase todos os transposons já descobertos, foram inativados por mutações naturais. Mas já foi possível obter transposon ativo capaz de realizar transposição, ele pertence à uma família de peixes actinopterigeos (salmonídeos), tal segmento de DNA foi obtido através de múltiplas mutagêneses dirigidas (FERNÁNDEZ, 2008).

Uma das desvantagens do transposon na transgenia é o limitado espaço para transportar genes externos (HOUDEBINE, 2002). Para se conseguir mais espaço e evitar que o transposon recombinante se alastre de forma desgovernada, é retirado o gene da enzima transposase, sendo adicionada no vetor, uma transposase exógena a fim de integrar o vetor recombinante no genoma hospedeiro (SILVA, 2009).

2.2.4. Animais transgênicos a partir de transferência nuclear

A transferência nuclear (TN) foi um método inovador para a ciência animal, entretanto isso só foi possível a partir de experimento feito em rãs em 1951, onde ovócitos foram enucleados e fusionados com células de embrião na fase de blástula. Eles chegaram a se desenvolver até o estágio de girino (BRIGGS & KING, 1952). A técnica utilizada hoje consiste na enucleação de ovócito maturado, que deve estar na fase MII da meiose. O procedimento de remoção do núcleo, é feito em um micromanipulador (Figura 3). O núcleo do ovócito deve ser corado com Hoechst 33342, porque só assim ele se torna visível no microscópio com luz ultravioleta (PEREIRA & FREITAS, 2009). Depois de removido, o núcleo poderá ser descartado porque somente o citoplasma será aproveitado. Em seguida deve-se obter uma célula diploide (transgênica que contenha as características desejadas), a célula então deve ser colocada no espaço perivitelino do ovócito doador de citoplasma (Figura 4) (RUMPF & MELO, 2005), que será submetido a pulsos elétricos que irão promover a fusão da célula com o citoplasma. O novo conjunto formado deve ser ativado de forma química ou elétrica para que se inicie o desenvolvimento embrionário (GIBBONS et al., 2014). Se o processo obtiver sucesso, resultará em um animal clonado, com as características do núcleo doador.



FIGURA 3 – Micromanipulador (Fonte: arquivo pessoal).

A transferência nuclear é um método que possui uma vantagem muito importante na produção de animais modificados, porque já é possível alterar o material genético de células doadoras de núcleo antes da TN. Existem várias técnicas para se alterar a informação genética de células que serão utilizadas, como a alteração via vetores retrovirais, via lipossomas e por eletroporação (BRESSAN, 2008). Para a produção de animais transgênicos, a técnica de transferência nuclear se torna uma opção interessante em relação ao método de microinjeção pronuclear, porque nela se economiza mais tempo e custos (POLEJAEVA & CAMPBELL, 2000; VISINTIN et al., 2008). E ainda é possível produzir “knock-out” gênicos e trocas de alelos por recombinação homóloga entre o DNA endógeno e exógeno das células doadoras (MCCREATH et al., 2000).

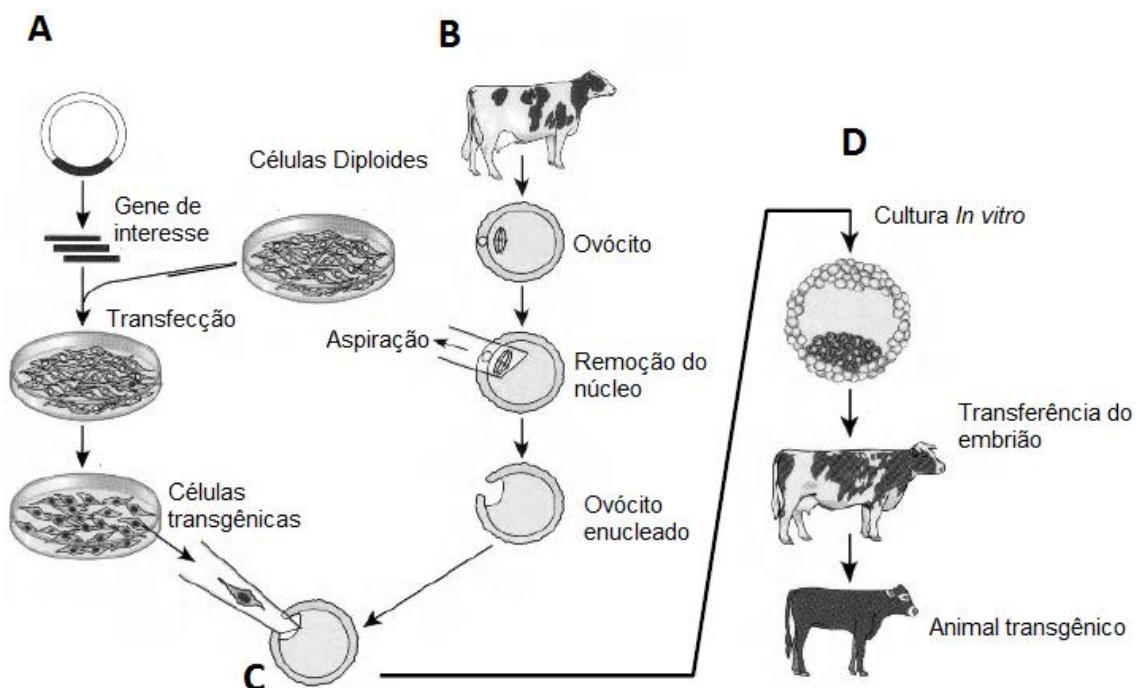


FIGURA 4 – Esquema ilustrativo que demonstra a técnica de transgenia animal por transferência nuclear. Na coluna (A) a célula com o gene de interesse é obtida, no (B) é coletado um ovócito na metáfase II para ser enucleado, no (C) a célula com o gene modificado é transferida para o ovócito enucleado, (D) processo de cultivo *in vitro* com posterior transferência do embrião para receptora (NIEMANN et al., 2009).

O sucesso nos métodos de transgenia por TN depende de certas exigências, e uma das mais importantes é a necessidade de células primárias ou de linhagens celulares compatíveis com as alterações genéticas essenciais para o ganho ou perda da função do futuro animal (VISINTIN et al., 2008). Mesmo assim a taxa de sucesso da técnica muitas vezes não ultrapassa 1% do total (SOLTER, 2000). Essa menor viabilidade dos embriões é expressa principalmente por causa da diminuição na taxa de implantação, pela maior mortalidade fetal e perinatal e também pelas diversas anomalias apresentadas em animais recém-nascidos (LIMA & SANTOS, 2010).

2.2.5. Transferência de gene mediada por espermatozoides

A transferência de gene mediada por espermatozoide (SMGT) é uma técnica que utiliza a habilidade do espermatozoide de transferir, incorporar e carrear o DNA para o ovócito durante a fertilização sendo possível produzir animais geneticamente alterados (LAVITRANO et al., 1989). A SMGT apesar de ser um ótimo método para gerar animais transgênicos, ainda possui limitações como a reduzida incorporação de DNAs exógenos pelo espermatozoide (CAMPOS, 2011). Outro problema é a atuação de enzimas DNases presentes no plasma seminal ou dentro do espermatozoide, que são capazes de destruir o material genético exógeno, o que irá reduzir o sucesso da transferência do gene externo (COLLARES et al., 2010).

O processo de incorporação do gene exógeno na SMGT pode ser feito de diversas formas como eletroporação, onde pulsos elétricos alternados irão abrir poros na membrana plasmática do espermatozoide que facilitará a internalização do DNA exógeno; o método de lipofecção também pode ser utilizado, que consiste na interação do lipossomo carregado positivamente com o DNA de carga negativa que formará lipoplexos que sofrem endocitose, e serão carregados para o núcleo. Outra maneira é através da incubação dos espermatozoides com o DNA exógeno (Figura 5), onde o sêmen é previamente lavado, para que o IF-1 (Fator inibitório 1) responsável por impedir a ligação de DNA ao espermatozoide seja removido, em seguida ele é incubado junto com gene de interesse. Haverá então a ligação do DNA com PLDNAs (proteínas ligadoras de DNA) presentes na

membrana do espermatozoide, que ativará o processo de internalização do material genético exógeno (FEITOSA, 2006). Além das técnicas citadas, existem também outras metodologias, como a modificação genética mediada por lentivirus ou injeção intratesticular de DNA, entre outras (AL-SHUHAIB et al., 2014).

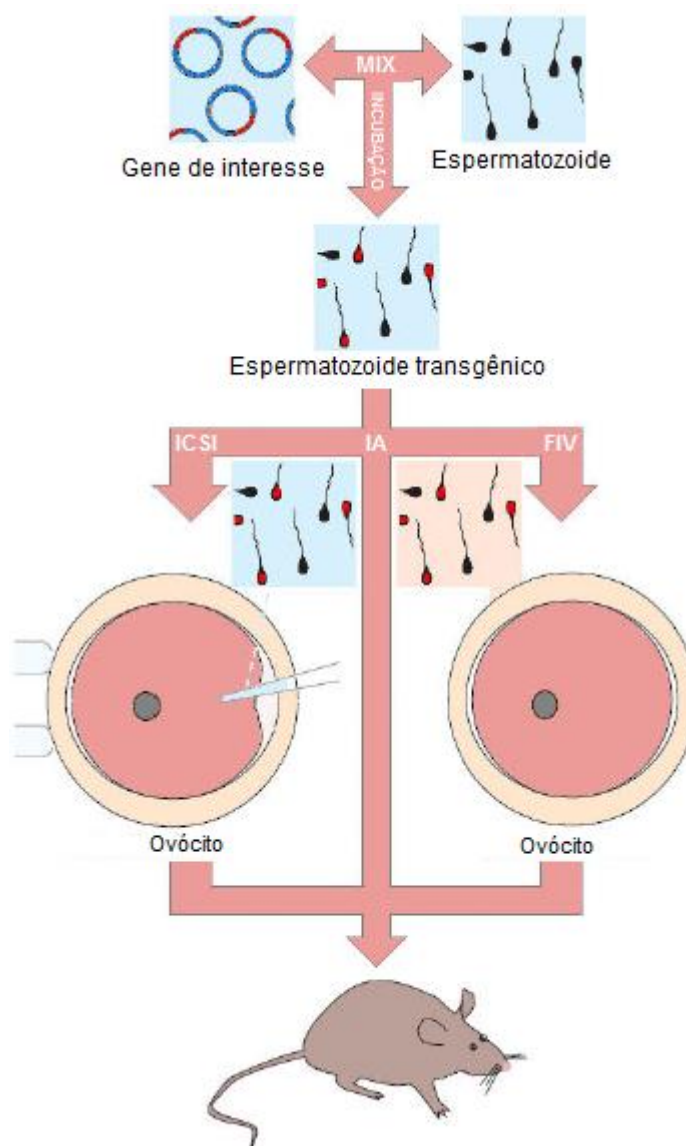


FIGURA 5 – SMGT utilizando a incubação de espermatozoides. Após a adição do gene modificado, o espermatozoide poderá ser utilizado para fertilizar o ovócito, podendo ser via ICSI, IA ou FIV (AL-SHUHAIB et al., 2014).

2.2.6. Transferência de gene mediada por células-tronco embrionárias

Neste método de transferência de gene exógeno para produção de animais transgênicos, é realizada a extração das células-tronco embrionárias (TE), contidas na massa celular interna de um embrião (EVANS & KAUFMAN, 1981; THOMSON et al., 1998; GUÉNET et al., 2015), na fase de blastocisto. Elas são classificadas como multipotentes, devido à sua capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular (RUMPF & MELO, 2005; SILVA, 2009; KUMAR et al., 2013). Quando são recolocadas em um blastocisto, as células-tronco embrionárias podem retomar o seu desenvolvimento normal (PEREIRA, 2008). Isto acontece porque o embrião é incapaz de diferenciar suas células das células multipotentes injetadas, os sinais responsáveis pelo desenvolvimento da massa celular interna são os mesmos das células TE (PIEDRAHITA, 1996). O método de transgenia é feito a partir da integração de sequências de DNA no genoma das células tronco extraídas, a introdução dos novos genes é realizada por recombinação homóloga *in vitro* (CAPECCHI, 1989; EVANS, 1998). Após a adição do gene exógeno, é realizada a seleção das células TE modificadas para posterior microinjeção em embriões (PESQUERO et al., 2007). Quando as células-tronco alteradas são injetadas em embriões, elas induzem o desenvolvimento de um organismo quimérico apresentando assim duas linhagens de células diferentes, sendo que uma possui as células multipotentes alteradas como origem e a outra do blastocisto receptor, que recebeu as células TE (MANSOURI, 1998; KUMAR et al., 2013). As quimeras produzidas precisam ser submetidas a uma série de cruzamentos, até que seja possível se obter um animal transgênico, com o gene exógeno presente em todos seus tipos celulares (RIBEIRO & AZEVEDO, 2001; RUMPF & MELO, 2005; FERNÁNDEZ, 2008; GARVIN et al., 2010).

A partir da combinação das células-tronco embrionárias e da recombinação homóloga, é possível realizar uma mutagênese condicional. Que irá gerar animais modificados, condicionados a uma indução proposital da expressão ou interrupção de um gene em algum tipo de célula ou em algum tempo de desenvolvimento (BABINET, 2000). Fato que difere das técnicas de microinjeção pronuclear, da mediada por retrovírus e transposons, onde a adição do novo gene é feita de forma aleatória (ROBL et al., 2007).

2.2.7. Confirmação da integração do DNA exógeno

Assim que o animal com possível transgene nasce, ele é submetido a exames que irão identificar a presença de material genético exógeno em seu genoma. Essa análise de DNA pode ser feita através de PCR (WHEELER et al., 2008) e/ou Southern blot (CAMPOS 2008; KUMAR et al, 2013).

A amostra a ser avaliada, pode ser em princípio, qualquer célula nucleada, que deverá ser coletada de órgãos ou fluidos corporais. Normalmente são coletadas amostras de sangue ou de tecido caudal do animal (BREM et al., 1993). O método de *Southern blot* é o mais recomendado para identificar com precisão a presença do gene exógeno no genoma do hospedeiro. Ele é capaz de indicar a posição da integração no genoma (KUMAR et al, 2013), a quantidade de cópias transgênicas, o tamanho de uma sequência-alvo e uma possível mutação (PINKERT, 2004). A técnica de PCR pode ser utilizada para identificar se o animal é transgênico em um menor período de tempo e também com menor custo (BREM; BERG & REICHENBACH, 1993), além de exigir uma quantidade pequena de amostra para o exame, entretanto ela não é capaz de fornecer tantas informações como o método de *Southern blot*.

2.3. Animais transgênicos em prol da saúde

O progresso das técnicas de adição de genes em células germinativas e somáticas nos animais domésticos e de laboratório foi um dos mais importantes saltos tecnológicos ocorridos nas últimas décadas. Animais com modificações genéticas têm sido utilizados como modelos que permitem estudar vários aspectos que envolvem a saúde humana, entre eles a regulação gênica, a ação de oncogenes, as interações celulares que envolvem o sistema imune (RIBEIRO & AZEVEDO, 2001), o uso de animais como modelo para estudar doenças humanas, uso de animais como doadores de órgãos e animais como biorreatores (PEÑARANDA & ASENSIO, 2008; KUMAR et al., 2013). A utilização de animais alterados em laboratório, ganhou uma grande importância no campo da biologia. Estima-se que pelo menos 90% dos animais transgênicos são gerados para os estudos básicos (CAMPOS, 2011).

Os camundongos têm sido o modelo animal favorito no estudo de doenças humanas. Vários motivos os tornam a escolha mais adequada: são animais de fácil manipulação devido ao seu pequeno tamanho, são fáceis de cuidar, possuem um ciclo de vida curto, além de produzir grandes ninhadas, que ajuda a obter um bom número para dados estatísticos (MILLER, 2008).

No estudo das doenças humanas, o uso de animais transgênicos possui fundamental importância, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos tratamentos (DORFMAN, 2012; MCGONIGLE & RUGGERI, 2013). No caso do Alzheimer, modelos animais que desenvolvem espontaneamente as características da doença, são difíceis de serem criados, por este motivo grandes investimentos têm sido feitos a fim de obter sucesso na criação de animais transgênicos que desenvolvam o Alzheimer (DORFMAN, 2012). No estudo das neoplasias, camundongos transgênicos possuindo o oncogene *neu* já foram obtidos. Este gene é responsável por causar câncer na glândula mamária após o início da puberdade (GARVIN et al., 2010). Esses modelos de animais transgênicos têm ajudado as pesquisas que envolvem o desenvolvimento, tratamento e prevenção de tumores. Além disso, os camundongos também têm fornecido valiosos modelos transgênicos para o estudo de doenças induzidas por vírus oncogênicos, como a leucemia humana de células T (WHEELER et al., 2008). Várias outras doenças ainda estão sendo estudadas em animais transgênicos como a esquizofrenia (DESBONNET et al., 2009) e a esclerose múltipla (HOLMOY et al., 2009), entre outras.

2.3.1 Animais transgênicos como biorreatores

Os fermentadores microbiológicos são os responsáveis pela produção de muitas proteínas terapêuticas humanas, porém o processamento microbiano não se mostra apropriado para um número grande de proteínas bioativas. Isso é em razão da incapacidade das bactérias em realizar reações de modificações pós-sintéticas, que são exigidas para a atividade biológica plena (COLLARES et al., 2007). Os animais alterados em laboratório são capazes de produzir proteínas em determinados órgãos (BURY, 2014), utilizando promotores tecido-específicos. Isso os torna úteis para serem utilizados como biorreatores capazes de produzir

proteínas de importância biomédica. Os animais de produção podem servir como verdadeiras fábricas especializadas na produção em larga escala de proteínas expressas em fluidos corporais (DYCK et al., 2003; LIMA & SANTOS, 2010;). As proteínas expressas no leite depois de isoladas têm vantagem sobre os tecidos, isso devido a constante produção e também pela facilidade de recuperação das proteínas (MEADE et al., 1999; RIBEIRO & AZEVEDO, 2001; CAVAGNARI, 2010; KUES & NIEMANN, 2011). Uma quantidade menor de proteínas terapêuticas, também pode ser produzida em ovos de galinhas, as vantagens da produção em ovos em relação à produção no leite, é devido a um menor custo de instalação, um período reduzido entre gerações, pequeno gasto com manutenção e um menor trabalho necessário (PEÑARANDA & ASENSIO, 2008; WHEELER et al., 2008). Além disso, o processo de purificação da proteína recombinante do ovo pode ser ainda mais fácil que a do leite, devido à proteína da clara ser bioquimicamente menos complexa (KWON et al., 2004).

Bovinos transgênicos capazes de produzir GH (hormônio do crescimento) no leite, já foram produzidos na Argentina no período entre 2002 e 2004 pela empresa privada Bio Sidus. A companhia afirma que um único animal é capaz de produzir até 15 gramas de proteína por dia, e 500 gramas por mês (CAMPOS, 2008). O Brasil já obteve sucesso na produção de animais transgênicos como biorreatores (FREITAS et al., 2014). Um grupo do laboratório de fisiologia e controle da reprodução da Universidade Estadual do Ceará foi o responsável por produzir um caprino transgênico capaz de expressar o gene do hG-CSF (Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano) (FREITAS et al., 2012). Proteínas como α -antitripsina, AT III, TPA, Fibrinogênio e anticorpos monoclonais já foram obtidas com sucesso da glândula mamária de caprinos e ovinos transgênicos (KUMAR et al., 2013). A hemoglobina humana funcional pode ser produzida a partir de suínos alterados em laboratório. A proteína transgênica com características similares a dos humanos pode ser purificada do sangue do porco (CHANG & D'AGNILLO, 1998), favorecendo assim os humanos que precisam de doação de sangue.

Animais como biorreatores podem influenciar de forma significativa na economia mundial. Estima-se que de 10 a 100 vacas têm potencial para produzir proteínas farmacêuticas suficientes para suprir toda a demanda mundial de

fármacos, reduzindo muito o custo de produção em relação ao sistema tradicional (VIEIRA, 2012).

2.3.2. Animais como doadores de órgãos para humanos

O transplante de órgãos entre espécies, também conhecido como xenotransplante (GIBBONS et al., 2014), é considerado uma alternativa que pode salvar milhões de pessoas que necessitam de doação. Baseado nisso, suínos transgênicos estão sendo desenvolvidos para expressar proteínas humanas na superfície de órgãos, para que assim eles possam ser utilizados como viáveis doadores de órgãos (CAMARA et al., 2008; KUMAR et al., 2013). Outra estratégia diferente vem sendo estudada para se obter sucesso no xenotransplante, ela consiste em retirar do genoma do suíno o gene que codifica a α -1,3-galactosiltransferase, uma enzima da superfície das células do animal que é detectada pelo sistema imunológico humano, sem ela, a rejeição por α -1,3-galactosiltransferase não acontece (CAMPOS, 2008). Corações de suínos estão sendo transplantados em macacos a fim de testar o resultado do método (PEREIRA, 2008; MOHIUDDIN et al., 2014). O suíno doméstico é o animal mais estudado em pesquisas de xenotransplante. Ele possui algumas vantagens em relação às outras espécies, como a similaridade dos órgãos, atingem sua maturidade em um menor espaço de tempo, podem ser mantidos em instalações simples, e também porque as técnicas de transgênese e de imunogenicidade estão bem estabelecidas nesta espécie (RUMPF & MELO, 2005).

O xenotransplante possui pontos positivos e negativos em relação ao tradicional transplante de órgãos. As vantagens incluem a grande disponibilidade de órgãos a serem transplantados e seu melhor aproveitamento devido a coleta imediata, onde os efeitos post-mortem, como alterações metabólicas e hemorragias não afetariam a viabilidade do órgão (PESQUERO et al., 2007). Os pontos negativos envolvem os riscos de transmissão de doenças do suíno para o homem, a incompatibilidade imunológica dos tecidos (CLARK & WHITELOW, 2003), além de questões éticas (ARQUÉ, 2007).

2.4. Aplicação dos animais transgênicos na produção

Através da introdução de genes específicos em animais domésticos, é possível obter várias características que favorecem a produção animal (WHEELER et al., 2008), como aumento na taxa de crescimento, melhor composição de carcaça, maior produção de leite e maior resistência à doenças (DZIADEK, 1996; PEÑARANDA & ASENSIO, 2008), além de várias outras aplicações para o setor produtivo.

A modificação da constituição do leite pela transgenia pode beneficiar um grande número de pessoas, principalmente os indivíduos que possuem deficiência na enzima lactase, que é responsável pela degradação da lactose (CAVAGNARI, 2010). No mercado já existem fórmulas comerciais de leite sem a presença da lactose, porém hoje se busca obter leite próprio para essas pessoas por meio de animais transgênicos, a fim de atender o grande mercado (JOST et al., 1999). Vacas capazes de produzir a lactoferrina humana na glândula mamária, também estão sendo estudadas (PLATENBURG et al., 1994; COOPER et al., 2013). A lactoferrina é uma substância que tem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, e poderia ser utilizada para melhorar a defesa imunológica de crianças que consomem este leite (CAVAGNARI, 2010). Animais capazes de produzir boas quantidades de beta e kappa-caseína na glândula mamária também estão sendo analisados. O leite desses animais poderia ser utilizado para aumentar a qualidade e o tempo de prateleira do leite e seus derivados (BROPHY et al., 2003).

Normalmente a eliminação ou controle de um agente infeccioso depende do uso de fármacos ou vacinas. Entretanto por intermédio da modificação genética é possível deixar os animais de produção mais resistentes a doenças. Bovinos mais tolerantes à tuberculose já podem ser obtidos por intermédio da adição de genes exógenos (TUGGLE & WATERS, 2015). Animais capazes de produzir lisozima humana também podem ser produzidos. Esta enzima tem poder antibacteriano que deixa vacas mais resistentes à mastite (LIU et al., 2014). Muitos investimentos ainda estão sendo feitos para obter animais resistentes a doenças, além das enfermidades já citadas, a gripe suína, febre aftosa (PEREIRA, 2008) e

encefalopatia espongiforme bovina (WEISSMANN et al., 2002; RICHT et al., 2007) também estão entre as mais estudadas.

Outra alternativa para o uso de animais transgênicos, está no aumento da produção. Ovelhas transgênicas criadas por microinjeção do gene IGF-1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1), foram capazes de produzir uma maior quantidade de lã (DAMAK et al., 1996). Suínos capazes de produzir uma maior quantidade de carne também já foram produzidos (PURSEL et al., 1999).

O primeiro animal alterado em laboratório, criado para o consumo humano, foi obtido por uma empresa dos Estados Unidos. Trata-se de um salmão transgênico que cresce mais rápido que o salmão não transgênico (Figura 6). O peixe em questão possui dois genes em seu genoma, um gene codifica o hormônio do crescimento, fazendo o animal ficar maior e o outro gene serve como anticongelante, que permite a continuidade do crescimento no inverno (YE et al., 2011). As Fêmeas são estéreis e crescem somente em condições de isolamento, isso é importante para evitar possíveis problemas relacionados à liberdade indesejada do animal, evitando assim situações de competição com os outros peixes não transgênicos (CLIFFORD, 2013).



FIGURA 6 – Comparação entre o salmão transgênico e o não transgênico (Eenennaam, 2006).

3. Conclusão

São visíveis os benefícios que a transgenia animal pode proporcionar para os humanos, e é notório que muito já foi descoberto na ciência animal. Porém, ainda há muito espaço para descobrir outras utilizações e estudar ainda mais as aplicações dos animais alterados em laboratório. Na área médica e de produção animal, os animais transgênicos ainda estão sendo muito testados, no entanto ainda não são plenamente utilizados de forma definitiva. Isso porque apesar de ser uma nova forma de utilização dos indivíduos, que poderia melhorar os resultados com animais, acaba não sendo 100% confiável em comparação aos métodos já utilizados tradicionalmente, como por exemplo no transplante de órgãos de suínos para humanos ou no consumo de produtos oriundos de animais transgênicos, onde danos a saúde humana a longo prazo são desconhecidos. Em tese, o xenotransplante seria capaz de solucionar a demanda de órgãos pelos humanos, Entretanto não se sabe ao certo os riscos que eles podem trazer, podendo solucionar um problema gerando outro, como uma possível transmissão de doenças entre espécies.

Outro ponto que deve ser levado em consideração está relacionado com a ética na utilização dos animais para estudos. Nos experimentos que envolvem a transgenia, os animais estão sempre em pleno uso, e é bem provável que em muitos casos não seja possível fazer testes com a total ausência de sofrimento. Isso abre margem para questionamentos relacionados ao bem-estar animal e ao poder do homem em manipular a vida de outros indivíduos em razão da satisfação e saúde dos humanos, que é certamente uma questão bem válida a se discutir.

4. Referências Bibliográficas

AIGNER, B.; RENNER, S.; KESSLER, B.; KLYMIUK, N.; KUROME, M.; WÜNSCH, A.; WOLF, E. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 7, p. 653-664, 2010.

AL-SHUHAIB, M.; AL-SAAD, A.; EWADH, M.; NOOR, M. Sperm Mediated Gene Transfer in Mammals; a Versatile Platform with Multiple Enhancements Techniques. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 5, p. 58-68, 2014.

ARQUÉ, A. B. Animales transgénicos como organismos artificiales. **Acta bioethica**, v. 13, n. 1, p. 61-70, 2007.

BABINET, C. Transgenic Mice An Irreplaceable Tool for the Study of Mammalian Development and Biology. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. suppl 2, p. S88-S94, 2000.

BOSCH, P.; FORCATO, D. O.; ALUSTIZA, F. E.; ALESSIO, A. P.; FILI A. E.; OLMOS, N. M. F.; LIAUDAT, A. C.; RODRÍGUEZ, N.; TALLURI, T. R.; KUES, W. A. Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 10, p. 1907-1929, 2015.

BOVERHOF, D. R.; CHAMBERLAIN, M. P.; ELCOMBE, C. R.; GONZALEZ, F. J.; HEFLICH, R. H.; HERNÁNDEZ, L. G.; JACOBS, A. C.; JACOBSON-KRAM, D.; LUIJTEN, M.; MAGGI, A.; MANJANATHA, M. G.; BENTHEM, J. V.; GOLLAPUDI, B. B. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. **Toxicol Sci**, v. 121, n. 2, p. 207-233, 2011.

BREM, G.; BERG, U.; H.D REICHENBACH. Producción de animales transgénicos in: PALMA. GUSTAVO, A & BREM, G. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. **Biología de la reproducción**. P. 155-167. 1993.

BRESSAN, F. **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 80f.

BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 38, n. 5, p. 455-463, 1952.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T.; WELLS, D.; L'HUILLIER, P.; LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 157-162, 2003.

BURY, N. M. Editorial: Reproducción asistida en los animales domésticos. **Revista Científica**, v. 24, p. 7-9 n. 1, 2014.

CAMARA, D.; DIMITROVA I. R.; DOYNOVA M.; JACHACZ L.; KACHAKOVA D.; KEPKA M.; Transgenic and cloned animals: Ethical Problems? EU SOCRATES ERASMUS. European Community IP Bioéthique en science de la vie et de l'environnement. **Agro campus Rennes**, University of Sofia "Sv. Kliment Ohridski", University of Life Sciences, Lublin. 20p. 2008.

CAMPOS, S. L. F. **Animais transgênicos utilizados como biorreatores**. 2008. 124 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CAMPOS, V. F. **Nanobiotecnologia aplicada à transgênese animal**. 2011. 76 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

CAPECCHI, M. R. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, v. 244, n. 4910, p. 1288-1292, 1989.

CASTRO, F. O. Modificación Genética de Animales de Granja In: PALMA, GUSTAVO A. **Biotecnología de la reproducción**. v. 01, p. 395-414, Balcarce Argentina, 2001.

CAVAGNARI, B. M. Animales transgénicos: usos y limitaciones en la medicina del siglo XXI. **Archivos argentinos de pediatría**, v. 108, n. 4, p. 343-349, 2010.

CHAN, A. W. S.; HOMAN, E. J.; BALLOU, L. U.; BURNS, J.C.; BREMEL, R. D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14028-14033, 1998.

CLARK, J.; WHITELOW, B. **A future for transgenic livestock**. *Nat Rev Genet*, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2003.

CLARK, J.; WHITELOW, B. A future for transgenic livestock. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2003.

CLIFFORD, H. Salmon-a pioneering application of biotechnology in aquaculture. **AquAdvantage**, 2013, Disponível em http://isbr.info/news?news_id=25>. Acessado no dia 23/06/2015 às 19:00.

COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V.; DESCHAMPS, J. C. Animais transgênicos biorreatores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, v.31, n.4, p.462-47, 2007.

COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V.; DESCHAMPS, J. C. Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. **Journal of biosciences**, v. 35, n. 1, p. 39-47, 2010.

COOPER, C. A; NELSON, K. M; MAGA, ELIZABETH A; MURRAY, J. D. Consumption of transgenic cows' milk containing human lactoferrin results in beneficial changes in the gastrointestinal tract and systemic health of young pigs. **Transgenic research**, v. 22, n. 3, p. 571-578, 2013.

D'AGNILLO, Felice.; CHANG, Thomas M. S. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 667-671, 1998.

DAMAK, S.; SU, H.; JAY, N. P.; BULLOCK, D. W. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 185-188, 1996.

DE LOS ANGELES, P. M.; ASENSIO, F. Animales Modificados Genéticamente:(II): Aplicaciones. **Profesión veterinaria**, v. 16, n. 68, p. 64-73, 2008.

DESBONNET, L.; WADDINGTON, J.; O'TUATHAIGH, C. P. Mutant models for genes associated with schizophrenia. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 1, p. 308, 2009.

DORFMAN, M. D. Animales Modificados Genéticamente En Investigación Farmacológica. Division of Neuroscience, **Oregon National Primate Research Center**, 9p, 2012.p. 394-399, 2003.

DZIADEK, M. Transgenic animals: how they are made and their role in animal production and research. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, p. 182-187, 1996.

DZIADEK, M. Transgenic animals: how they are made and their role in animal production and research. **Australian veterinary journal**, v. 73, n. 5, p. 182-187, 1996.

ELLIS, JAMES.; BERNSTEIN, A. L. A. N. Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 4, p. 1621-1627, 1989.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

EVANS, M. **Tissue culture of embryonic stem cells**. Cell Biology: a Laboratory Handbook, second edition, Academic Press, v. 3, 1998

FEITOSA, W. B. **Espermatozóide bovino como vetor de transgene: interação do DNA exógeno e viabilidade espermática**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 138 p.

FERNÁNDEZ, P. N. **TRANSFERENCIA GÉNICA EN ANIMALES**: Experto Universitario de Biotecnología Aplicada a los Alimentos, 53 p. 2008.

FREITAS, V. J. F.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; SOUSA, F. C.; ALCÂNTARA-NETO, A. S.; ALBUQUERQUE, E. S. MELO, C. H. S. RODRIGUES, V. H. V. BATISTA, R. I. T. P.; DVORYANCHIKOV, G. A.; SEROV, O. L.; SEROVA, I. A.; MOURA, R. R.; ANDREEVA, L. E.; MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; PEREIRA, A. F.; LOPES-JR, E. S. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1, p. 105-113, 2012.

FREITAS, V. J.F.; MELO, L. M.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; TEIXEIRA, D. I. A. CONERA VII. in: **TRANSGÊNESE EM CAPRINOS**. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 402-406, 2014.

GADEA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A. **Métodos de generación de cerdos transgénicos**. Rev. ITEA, v. 106, p. 31-45, 2010.

GARVIN W. Animales transgénicos. Disponível em <http://archiv.ipn.uni-kiel.de/eibe/Unit11ES.pdf>>. Acessado no dia 18/05/2015 às 15:27.

GIBBONS, A.; BEVACQUA, R. J.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; PEREYRA-BONNET, F.; CUETO, M.; BRUNO-GALARRAGA, M.; SALAMONE, D. Transgénesis: una moderna biotecnología reproductiva en animales de interés zootécnico. RIA. **Revista de investigaciones agropecuarias**, v. 40, n. 2, p. 141-144, 2014.

GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v. 77, n. 12, p. 7380-7384, 1980.

GORDON, J. W. Transgenic animals. **International Review of Cytology**, v. 115, p.171-229, 1989.

GUÉNET, J.; BENAVIDES, F.; PANTHIER, J.; MONTAGUTELLI, X. Transgenesis and Genome Manipulations. In: Genetics of the Mouse. **Springer Berlin Heidelberg**, 2015. p. 267-317.

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. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 405-409, 2004.

HOLMOY, T.; HARBO, H.; VARTDAL, F.; SPURKLAND, A. Genetic and molecular approaches to the immunopathogenesis of multiple sclerosis: an update. **Current molecular medicine**, v. 9, n. 5, p. 591-611, 2009.

HOUEBINE, L. M. From The Gene To The Transgenic Animal. In: Animal Transgenesis AND Cloning. **West Sussex: Wiley**, p.1- 32, 2003.

HOUDEBINE, L. M. Methods to generate transgenic animals. In: **Genetic Engineering in Livestock**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 31-48.

HOUDEBINE, L. M. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. **Journal of Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 145-160, 2002.

HU, WEI-SHAU.; PATHAK, VINAY K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 493-512, 2000.

IVICS, Z.; MÁTÉS, L.; YAU, T. Y.; LANDA, V.; ZIDEK, V.; BASHIR, S.; HOFFMANN, O. I.; HIRIPI, L.; GARRELS, W.; KUES, W. A.; BÖSZE, Z.; GEURTS, A.; PRAVENEK, M.; RÜLICHE, T.; IZSVÁK, Z. Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. **Nature protocols**, v. 9, n. 4, p. 773-793, 2014.

JAENISCH, R.; FAN, H.; CROKER, B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 10, p. 4008-4012, 1975.

JAHNER, D.; JAENISCH, R. Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. 1985. **Nature**, v. 325, p.594-597, 1985.

JOST, B.; VILOTTE, J. L.; DULUC, I.; RODEAU, J.; FREUND, J. N. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 160-164, 1999.

KUES, Wilfried A.; NIEMANN, Heiner. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive veterinary medicine**, v. 102, n. 2, p. 146-156, 2011.

KWON, M. S.; KOO, B. C.; CHOI, B. R.; LEE, H. T.; KIM, Y. H.; RYU, W. S.; SHIM, H.; KIM, J. H.; KIM, N. H.; KIM, T. Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 2, p. 442-448, 2004.

LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M.; DOLCI, S.; FARACE, M. G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. **Cell**, v. 57, n. 5, p. 717-723, 1989.

LIMA, G. L.; DOS SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de moifopa, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. S36-S42, Mossoró, RN, 2010.

LIU, X.; WANG, Y.; TIAN, Y.; YU, Y.; GAO, M.; HU, G.; SU, F.; PAN, S.; LUO, Y.; GUO, Z.; QUAN, F.; ZHANG, Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, China v. 281, n. 1780, 10p, 2014.

MAKAŁOWSKI, W.; PANDE, A.; GOTEA, V.; MAKAŁOWSKA, I. Transposable elements and their identification. In: **Evolutionary Genomics**. Humana Press, 2012. p. 337-359.

MANSOURI, A. **Gene targeting by homologous recombination in embryonic stem cells**. Cell Biology: a Laboratory Handbook, second edition, Academic Press, v. 3, 1998.

MCCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 36, n. 6, p. 344-355, 1950.

MCCREATH, K. J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K. H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1066-1069, 2000.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. **Biochemical pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 162-171, 2014.

MEADE, H. M.; ECHELARD, Y.; ZIOMEK, C. A.; YOUNG, J. M.; HARVERY, M.; COLE, E. S.; GROET, S.; CURLING, J. M. **Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals**. In: Fernandez JM, Hoeffler JP (eds) Gene Expression Systems, Academic Press San Diego, USA, p. 399–427, 1999.

MILLER, D. G.; ADAM, M. A.; MILLER, A. Dusty. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 8, p. 4239-4242, 1990.

MILLER, M. Transgenic Applications In: ABELE, TRAVIS & MILLER, MICHELLE. **TRANSGENIC ANIMALS**. 2008, Tese de doutorado Worcester Polytechnic Institute, f. 20-34.

MOHIUDDIN, M. M.; SINGH, A. K.; CORCORAN, P. C.; HOYT, R. F.; THOMAS, M. L.; AYARES, D.; HORVATH, K. A. Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 148, n. 3, p. 1106, 2014.

NIEMANN, H.; KUES, Wilfried A. Transgenic farm animals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 6, p. 762-770, 2007.

NIEMANN, H.; KUES, W.; CARNWATH, J. W. Transgenic farm animals: Current status and perspectives for agriculture and biomedicine. In: **Genetic Engineering in Livestock**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 1-30.p. 139-144, 2008.

PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD M. G.; BIRNBERG, N. C.; EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. **Nature**, v. 300, n. 5893, p. 611-615, 1982.

PEÑARANDA, M. A.; ASENSIO, F. PEÑARANDA, María de los Angeles; ASENSIO, Fernando. Animales modificados genéticamente: técnicas de obtención. **Profesión veterinaria**, v. 16, n. 67, p. 22-30, 2007.

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118-128, 2009.

PEREIRA, L. V. Animais transgênicos: nova fronteira do saber. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 40-42, 2008.

PESQUERO, J. B.; BAPTISTA, H. A.; MOTTA, F. L. T.; DE OLIVEIRA, S. M. Aplicações dos animais transgênicos. **Scientific American Brasil**. edição, v. 56. 6p. 2007.

PFEIFER, A. Lentiviral transgenesis. **Transgenic research**, v. 13, n. 6, p. 513-522, Munich, Germany, 2004.

PIEDRAHITA, J. Los animales transgênicos y su potencial en el desarrollo de la biotecnología animal. **Corpoica**, Colombia, v. 1, n. 1, p. 29-34, 1996.

PINKERT C. A. Engenharia genética em animais domesticos In: HAFEZ E.S.E & HAFEZ .B. **Reprodução animal**. V.07, p. 319-331, Kiawah Island, 2004.

PLATENBURG, G. J.; KOOTWIJK, E. P.; KOOIMAN, P. M.; WOLOSHUK, S. L.; NUIJENS, J. H.; KRIMPENFORT, P. J.; PIEPER, F. R.; DE BOER, H. A.; STRIJKER, R. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. **Transgenic research**, v. 3, n. 2, p. 99-108, 1994.

POLEJAEVA, I. A.; CAMPBELL, K. H. S. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 117-126, 2000.

PURSEL, V. G.; WALL, R. J.; MITCHELL, A. D.; ELSASSER, T. H.; SOLOMON, M. B.; COLEMAN, M. E.; MAYO, F.; AND SCHWARTZ, R. J. Expression of insulin-like growth factor-1 in skeletal muscle of transgenic pigs. In : **Transgenic Animals in Agriculture**. Eds J. D. Murray, G. B. Anderson, A. M. Oberbauer and M. M. McGloughlin, CABI Publishing: New York, p. 131–144, 1999.

PURSEL, V. G.; REXROAD JR, C. E. Status of research with transgenic farm animals. **Journal of animal science**, v. 71, p. 09-19, 1993.

RAJORIYA, R.; RAJORIYA, S.; KUMAR, N. **Transgenic Animals: Prospects For Improving Livestock Productivity**. College of Veterinary Science and Animal Husbandry, INDIA 20p. 2013.

RIBEIRO, L. A.; AZEVEDO, V. Animais Geneticamente Modificados (Transgênicos) e a Legislação Brasileira de Biossegurança in: ODA, Leila Macedo. A Biotecnologia e sua Regulamentação no Brasil e no Mundo. **MANUAL DE BIOSSEGURANÇA**, Diretoria de Vigilância e Controle Sanitário 2001, p. 347-456.

RICHT, J. A.; KASINATHAN, P.; HAMIR, A. N.; CASTILLA, J.; SATHIYASEELAN, T.; VARGAS, F.; SATHIYASEELAN, J.; WU, H.; MATSUSHITA, H.; KOSTER, J.; KATO, S.; ISHIDA, I.; SOTO, C.; ROBL, J. M.; KUROIWA, Y. Production of cattle lacking prion protein. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 132-138, 2007.

ROBL, J. M.; WANG, Z.; KASINATHAN, P.; KUROIWA, Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 127-133, 2007.

RUMPF, R., MELO, E. O. Produção de animais transgênicos: metodologias e aplicações. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 0102– 0110; 145, Brasília, 27p, 2005.

SILVA, C. A. **Produção de camundongos transgênicos para o estudo de terapias celulares**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 103 p, 2009.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature reviews genetics**, v. 1, n. 3, p. 199-207, 2000.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TUGGLE, CHRISTOPHER K.; WATERS, W. RAY. Tuberculosis-resistant transgenic cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 3854-3855, 2015.

VAN EENENNAAM, A. L.; OLIN, P. G. Careful risk assessment needed to evaluate transgenic fish. **California Agriculture**, v. 60, n. 3, p. 126-131, 2006.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; PECORA, M. Biotecnologias Da Reprodução Animal. Clonagem e transgenia animal, **Departamento de Reprodução Animal**, FMVZ, USP, São Paulo, p. 139 -144, 2008.

YE, X.; TIAN, Y. Y.; GAO, F. Y. Progress in transgenic fish techniques and application. **Yi chuan Hereditas/Zhongguo yi chuan xue hui bian ji**, v. 33, n. 5, p. 494-503, 2011.

WEISSMANN, C; ENARI, M; KLÖHN, P. C; ROSSI, D; FLECHSIG, E. Transmission of prions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. Supplement 2, p. S157-S165, 2002.

WHEELER, M.; LIMA, A. S.; MALUSKY, S. A.; DAVIDSON, T.; FERGUSON, C. E.; MELO, M. R. B. Produção de animais transgênicos nas espécies domésticas In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, São Paulo, p.365-385, 2008.

5. Relatório Final De Estágio Obrigatório

Local de estágio: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília DF

Período 1: Estágio no campo Experimental Fazenda Sucupira, do dia 02/02/2015 a 08/05/2015.

Período 2: Estágio na Embrapa CENARGEN - Prédio da Biotecnologia, do dia 11/05/2015 a 29/05/2015.

5.2. Atividades desenvolvidas

Primeiramente o estágio foi realizado na Fazenda Sucupira, lá a rotina com bovinos, ovinos, caprinos e equinos era diária. Os procedimentos realizados e/ou acompanhados foram: diagnóstico de gestação e avaliação da dinâmica folicular por ultrassonografia em bovinos e caprinos, palpação retal em bovinos, manejo de bovinos, produção "*in vitro*" de embriões, transferência de embriões, congelamento de sêmen e de embriões, coleta de sêmen, coleta de embriões, lavagem e esterilização de materiais e inseminação artificial em bovinos.

A segunda etapa do estágio ocorreu no prédio PBI da Embrapa CENARGEN, os procedimentos realizados e/ou acompanhados foram: produção "*in vitro*" de embriões, técnica de transferência nuclear, PCR em tempo real e produção de micropipetas.

Semanalmente os alunos e pesquisadores da Embrapa participavam de um seminário, que ocorria às quartas-feiras, onde um artigo científico era apresentado por estudantes de mestrado e doutorado e após a apresentação o assunto do dia era discutido entre as pessoas presentes.

QUADRO 1 - Procedimentos realizados e/ou acompanhados no período de estágio na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Procedimentos	Quantidade aproximada
Acompanhamento / Avaliação da dinâmica folicular por ultrassonografia em bovinos	200
Acompanhamento / Avaliação da dinâmica folicular por ultrassonografia em caprinos	25
Acompanhamento / Avaliação da dinâmica folicular por ultrassonografia em equinos	15
Acompanhamento / Coleta de sêmen bovino	10
Acompanhamento / Coleta de sêmen equino	3
Acompanhamento / Congelamento de embriões	3
Acompanhamento / Congelamento de sêmen	2
Acompanhamento / Diagnóstico de gestação por ultrassonografia em Ovinos	15
Acompanhamento / Inseminação artificial em bovinos	20
Acompanhamento / PCR em tempo real	2
Acompanhamento / Produção "in vitro" de embriões	45
Acompanhamento / Protocolo hormonal em vacas	60
Acompanhamento / Técnica de transferência nuclear	3
Acompanhamento / Transferência de embriões	10
Acompanhamento / Vitrificação de embriões	2
Anestesia Epidural	40
Aspiração de ovários obtidos em abatedouros	700
Coleta de embriões bovinos	15
Diagnóstico de gestação por ultrassonografia em bovinos	25
Lavagem e esterilização de materiais	60
Palpação retal em vacas	35
Produção de micropipetas	150

5.3. Considerações Finais

Foi enorme o conhecimento prático e teórico adquirido no período de estágio, lá tive a oportunidade de aplicar muitas biotécnicas vistas em sala de aula e descritas em livros. Também ganhei bastante com dicas, instruções e conselhos de mestrandos, doutorandos e pesquisadores. O estágio foi certamente uma experiência muito positiva em todos os aspectos, e espero poder aplicar tudo que aprendi de alguma forma, colocando em prática e pesquisando mais sobre as biotécnicas realizadas lá, e passando o conhecimento adquirido para outras pessoas.