



# ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Fotos cedidas pelos autores

Geração de animais geneticamente modificados no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP-EPM



**Figura 1.** Camundongo Vitor, o primeiro camundongo transgênico gerado pela técnica de microinjeção pronuclear no Brasil

## A criação do laboratório de animais transgênicos da UNIFESP

A tecnologia para a geração de animais transgênicos, apesar de já ser rotineiramente empregada em laboratórios comerciais e de pesquisa em muitos países, desde as duas últimas décadas, ainda é incipiente no Brasil. Pesquisadores de várias áreas vêm utilizando esses animais com maior frequência a cada dia, fazendo dessa tecnologia uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, na produção de moléculas comercialmente importantes, na elucidação de mecanismos biológicos, entre muitas outras aplicações. Assim como no resto do mundo, a tendência à utilização desses modelos é cada vez maior no Brasil, o que aumenta a necessidade de implantarem-se laboratórios que dominem essa tecnologia a fim de fornecer modelos especiais aos pesquisadores nacionais, bem como dispor de biotérios capazes de realizar

a manutenção das linhagens já importadas, eliminando a dependência de laboratórios do exterior.

Com esse objetivo foi que, em 1996, o então Diretor Técnico e Coordenador Científico do CEDEME, Prof. Luiz Edmundo Magalhães, desenvolveu esforços para congregar pesquisadores e técnicos interessados na produção de animais transgênicos, procurando criar uma equipe capaz de realizar essa nova e importante tarefa, àquela época ainda completamente inédita no Brasil. Assim, os pesquisadores da UNIFESP, Prof. João Bosco Pesquero, recém-chegado da Alemanha, onde desenvolveu seu pós-doutoramento na geração e caracterização de vários modelos transgênicos e o Prof. Luís Antônio Travassos, usuário de várias linhagens transgênicas importadas, mantidas pelo CEDEME, foram convidados a integrar o grupo.

A bióloga, Dra. Heloísa Allegro Baptista, já com experiência nas técnicas de fertilização *in vitro*, integrou-se ao CEDEME, tendo recebido treinamento na área de geração de animais transgênicos, na Argentina e na Alemanha. A criação de uma vaga de docente para o CEDEME possibilitou a contratação da Prof<sup>a</sup>. Clélia Rejane Antônio, doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo. Os alunos de pós-graduação Alberto Navarro e Regiane Sabatini, e os funcionários do CEDEME, Satiko Okamoto e Gui Mi Ko também foram incorporados ao grupo.

Em fevereiro de 2000, foi aprovado o projeto multiusuários da FAPESP intitulado "Implantação de laboratórios para a produção e manutenção de animais transgênicos", sob a coordenação do Prof. Aron Jurkiewicz. Um ano

### João Bosco Pesquero

Ph.D. Biologia Molecular  
Departamento de Biofísica e Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME)  
Universidade Federal de São Paulo  
São Paulo, SP  
[jbpesq@biofis.epm.br](mailto:jbpesq@biofis.epm.br)

### Luiz Edmundo de Magalhães

Professor Titular de Genética e Evolução  
Departamento de Biologia do Instituto de Biociências  
Universidade de São Paulo - USP

### Heloísa Allegro Baptista

Ph.D. Biologia Molecular  
Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME)  
Universidade Federal de São Paulo  
São Paulo, SP  
[allegro@biofis.epm.br](mailto:allegro@biofis.epm.br)

### Regiane Angélica Sabatini

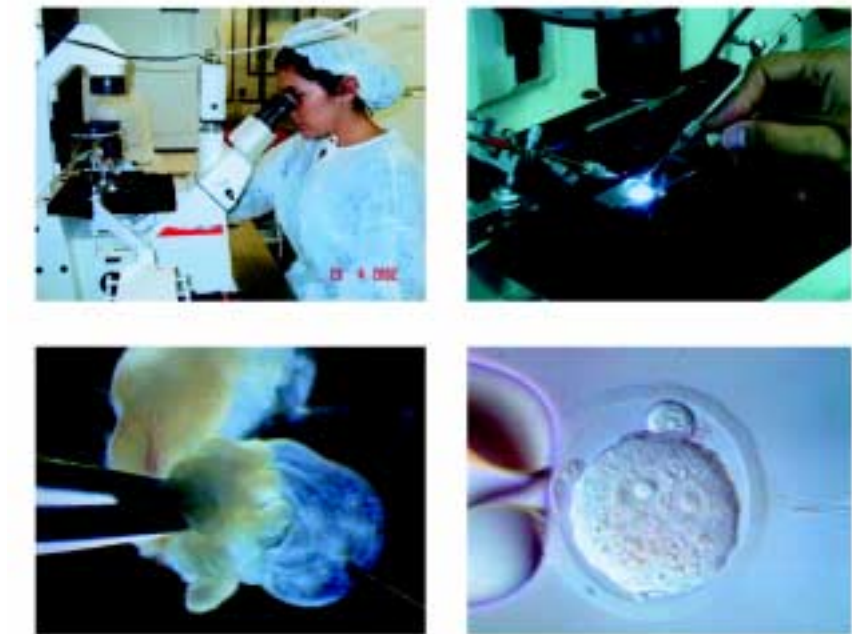
Departamento de Biofísica e Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME)  
Universidade Federal de São Paulo  
São Paulo, SP  
[regiane@biofis.epm.br](mailto:regiane@biofis.epm.br)

e meio depois, os laboratórios de biologia molecular e de produção de animais transgênicos do CEDEME já estavam instalados, sendo então gerados os primeiros embriões quiméricos de camundongo. Finalmente, em dezembro de 2001, Vitor, o primeiro animal transgênico produzido no Brasil pela técnica de microinjeção pronuclear foi obtido. Esse fato representou um marco na produção nacional de animais transgênicos e iniciou definitivamente o projeto de fornecimento desses modelos pelo CEDEME, para pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo, do Brasil e da América Latina.

### Histórico dos animais transgênicos

Antes do aparecimento das técnicas de biologia molecular aplicadas à genética, os únicos modelos animais para se estudar a regulação e função de genes e a compreensão dos sistemas biológicos de mamíferos eram os mutantes espontâneos. Para se provar a base genética da mutação, os animais tinham que apresentar um fenótipo alterado e transmiti-lo para seus descendentes e posteriormente, tentativas eram feitas com o objetivo e se isolar os defeitos genéticos de interesse. Com os avanços das técnicas de biologia molecular e celular e da engenharia genética, novas metodologias passaram a ser empregadas e tornou-se possível a manipulação do DNA, bem como a alteração controlada do genoma. Dessa forma, as técnicas para a geração de modelos transgênicos representaram uma das mais promissoras biotecnologias tanto para fins comerciais como para diversas áreas da pesquisa básica.

Pouco antes da década de setenta, o termo transgênico começou a ser utilizado na literatura científica em inúmeros estudos mostrando a introdução de fragmentos de DNA *in vitro* em células procarióticas e eucarióticas e indução da expressão de genes em vários tipos celulares (Gavrilova, 1967; Loyter e cols., 1975). Mais tarde, os transgênicos foram conceituados como animais ou organismos cujo patrimônio genético fora manipulado artificialmente pela introdução, modificação

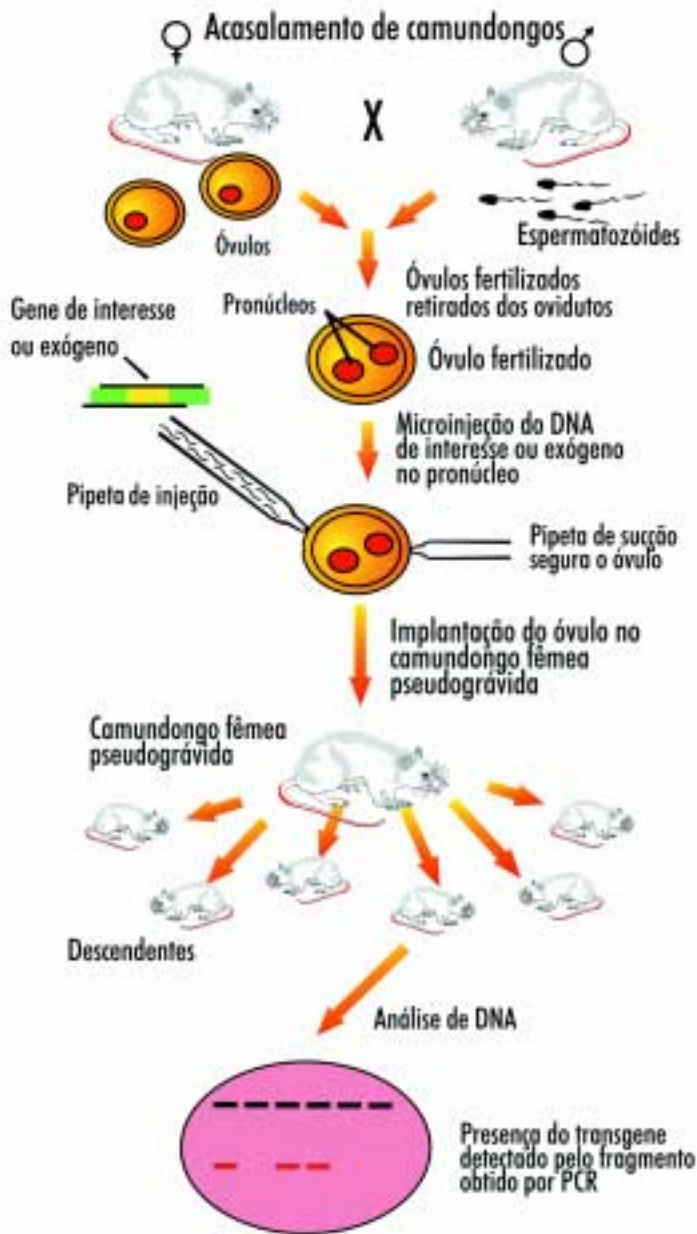


**Figura 2.** Micromanipulador acoplado ao microscópio invertido utilizado na microinjeção de embriões (em cima à esquerda). Detalhe das agulhas de sucção e injeção do sistema de micromanipulação (em cima à direita). Fotografia de um oviduto retirado de uma fêmea doadora contendo massa de embriões no momento da coleta (embaixo à esquerda, aumento de 20X). Microinjeção do DNA em um embrião contendo os prónucleos (embaixo à direita, aumento de 400X)

ou deleção de uma seqüência de DNA no seu genoma, incluindo a linhagem de células germinativas, de tal forma que essa alteração fosse transferida aos seus descendentes (Fukamizu, 1993). O termo transgênico, portanto, engloba animais que tiveram genes adicionados (transgênicos por adição), modificados (*knockin*) ou retirados (*knockout*). Em 1982, a primeira linhagem de camundongos transgênicos por adição foi produzida e caracterizada por Richard Palmiter, da Universidade da Pensilvânia, Ralph Brinster, da Universidade de Washington e colaboradores. Naquele estudo inédito, os pesquisadores construíram um DNA que continha uma cópia do gene do hormônio de crescimento de ratos sob o controle do promotor do gene de metalotioneína-I capaz de dirigir a expressão do gene para vários tecidos. Centenas de cópias dessa construção de DNA foram microinjetadas em embriões de camundongos posteriormente transferidos para mães de aluguel. Dos vinte e um camundongos nascidos, sete carregavam a construção do gene exógeno, sendo que seis se desenvolveram mais

rápido e atingiram um tamanho duas vezes maior que os controles não transgênicos. Esse resultado foi um marco no desenvolvimento de animais transgênicos, despertando grande atenção na mídia em todo o mundo, quando o camundongo “gigante” ficou famoso na capa da revista científica *Nature* (Palmiter e cols., 1982).

O sucesso desse trabalho só foi possível graças a estudos anteriores de outros pesquisadores que relatavam a introdução direta de material genético exógeno em embriões de camundongo antes mesmo do aparecimento das técnicas de DNA recombinante. Em 1974, Rudolf Jaenisch e Beatriz Mintz confirmaram a presença de DNA exógeno em diversos tecidos de camundongos após a microinjeção de DNA do vírus SV40 no interior da cavidade blastocística de embriões (Jaenisch e Mintz, 1974). A integração de DNA exógeno nas células germinativas foi detectada em estudos posteriores após a exposição de embriões de camundongos ao retrovírus da leucemia murina de Moloney (*Moloney murine leukemia virus*, M-MuLV), que trans-



**Figura 3.** Esquema da geração de animais transgênicos pelo método de microinjeção pronuclear

mitiram a alteração aos seus descendentes (Jaenisch, 1976 e 1977). Em 1980, Gordon e cols. Utilizaram, pela primeira vez, a microinjeção pronuclear de uma construção viral em embriões recém-fertilizados para a geração de um camundongo transgênico por adição (Gordon e cols., 1980).

Os primeiros animais transgênicos *knockout*, produzidos pela técnica de recombinação homóloga em células-

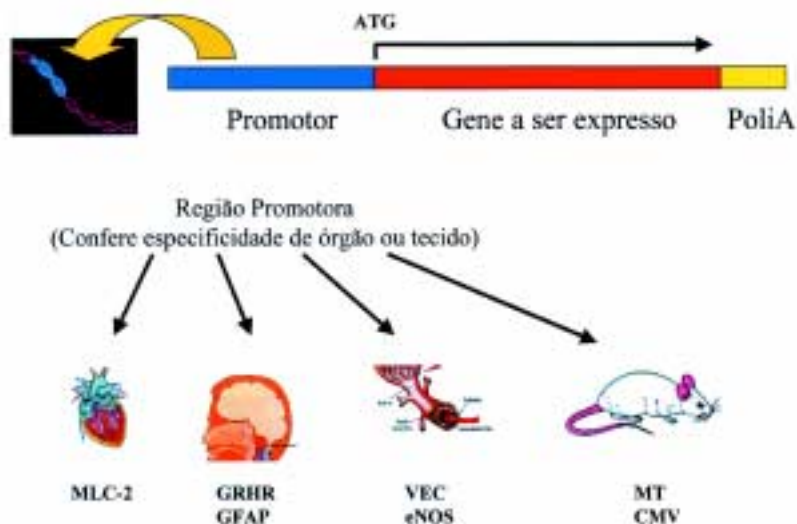
tronco só foram gerados em 1987, por dois grupos diferentes (Doetschmann e cols, 1987; Thomas e Capecchi, 1987). Esses animais foram produzidos por mutação dirigida do gene da hipoxantina fosforibosil transferase.

Desde então, a aplicação das técnicas de transferência de genes tem tornado possível a produção de animais transgênicos de diferentes espécies como boi, porco, ovelha, coelho,

rato e camundongo, sendo este último o mais utilizado em pesquisas, por apresentar notáveis vantagens como menor tamanho, custo de manutenção reduzido, embriões de boa qualidade para manipulação, além de ser uma das poucas espécies cuja manutenção de células-tronco indiferenciadas em cultura é viável, o que possibilita a retirada de genes por recombinação homóloga e geração de modelos *knockout* (Hammer e cols., 1985; Mullins e cols., 1990; Hammer e cols., 1990; Wall e cols., 1991; Pursel e cols., 1989; Hogan e cols., 1986). Outro fato importante que aponta para o uso cada vez maior dessa espécie é o seqüenciamento total de seu genoma recentemente finalizado.

### Aplicações da tecnologia transgênica

As aplicações da tecnologia transgênica são inúmeras e em diferentes campos de atuação. Em pesquisa básica, no estudo da regulação e função de seqüências genéticas específicas. Em pesquisa biomédica, na criação de modelos animais de doenças humanas, entre elas, doenças cardiovasculares, auto-imunes e neurológicas, AIDS e câncer. Animais com mutações que mimetizam as principais características de uma determinada anomalia são um passo fundamental na pesquisa das doenças genéticas. Tais modelos animais permitem o exame detalhado da fisiopatologia da doença, além de servirem para delinear novas formas de tratamento, desenvolvimento de testes-diagnósticos, agentes terapêuticos inovadores e em terapia gênica. Em indústria biotecnológica, na produção de proteínas recombinantes humanas valiosas, como enzimas, hormônios e fatores de crescimento, por animais domésticos que funcionam como biorreatores. Um exemplo bastante utilizado é a produção de proteínas no leite através da expressão dirigida às glândulas mamárias. Finalmente, o aspecto mais controverso do uso dessa tecnologia envolve o melhoramento genético de animais domésticos de interesse econômico em larga escala, decorrente de modificação da anatomia e de fisiologia do animal, como, por exem-



**Figura 4.** Esquema da construção de DNA utilizada para a geração de animais transgênicos contendo região promotora, região codificadora e cauda poli-A. Na parte inferior da figura estão mostrados alguns promotores tecido-específicos. MLC = cadeia leve da miosina; GFAP = proteína ácida fibrilar glial; GRHR = Receptor do hormônio liberador de gonadotrofina; VEC = Células endoteliais vasculares; eNOS = Sintase de óxido nítrico endotelial; MT = metalotioneína; CMV = citomegalovírus

plo, aumento da massa corpórea, diminuição de gordura, resistência a doenças, maior produção de carne, de leite, etc.

### Técnicas utilizadas para geração de animais transgênicos por adição

Nos últimos anos, várias técnicas têm sido utilizadas para produzir animais transgênicos por adição, entre elas, infecção de embriões por vetores retrovirais (Nagano e cols, 2001), agregação de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (Gossler e cols., 1986; Wood e cols., 1993), transferência de segmentos de cromossomos (Richa e Lo, 1989) e transferência de DNA mediada por espermatozoides (Lavitrano e cols., 1989). Atualmente, o método utilizado pela maioria dos centros produtores de transgênicos é a microinjeção pronuclear, a qual permite a introdução de seqüências de até 50 kb de diferentes espécies no genoma de mamíferos. Além disso, pela utilização dessa técnica, são geralmente obtidos altos níveis de expressão do transgene (Rulicke e Hubscher, 2000; Niemann e Kues, 2000).

### Microinjeção Pronuclear - A geração do camundongo "Vitor"

O camundongo Vitor foi o primeiro animal transgênico no Brasil gerado por microinjeção pronuclear (Figura 1). Nessa técnica, centenas de cópias do DNA exógeno são injetadas diretamente em um dos pronúcleos (masculino ou feminino) de embriões recém-fertilizados coletados do oviduto de fêmeas doadoras superovuladas. Para tal, utiliza-se um micromanipulador acoplado a um microscópio invertido de alta resolução (Figura 2). Após a micromanipulação, os embriões são transferidos para uma "fêmea receptora" pseudo-grávida, que levará a termo o nascimento dos animais que serão, posteriormente, genotipados quanto à presença do gene exógeno (Figura 3). A construção de DNA injetada é composta por um promotor, uma região codificadora do gene e uma região 3' não traduzida (Figura 4). A especificidade da expressão do gene integrado é obtida mediante o uso de promotores que dirigem a expressão do gene, podendo ser ubíquos ou específicos. No primeiro caso, a expressão do gene acontece em uma grande variedade de tecidos e o objetivo é estudar o

efeito da superexpressão geral de um gene. Um exemplo bastante utilizado é o promotor do gene da metalotioneína. No segundo caso, o promotor dirige a expressão do transgene para determinados tecidos ou células (Figura 4).

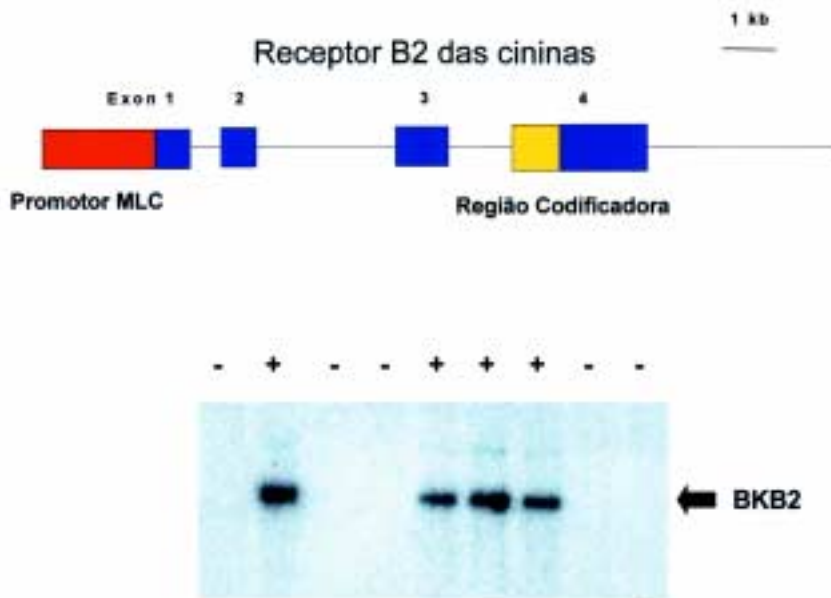
Para a geração do camundongo Vitor, foi utilizado o promotor da cadeia leve de miosina, o qual dirigiu a superexpressão do gene do receptor B2 de cininas de rato especificamente para o tecido cardíaco do animal (Figura 5). Esse modelo será utilizado para o estudo do papel protetor das cininas em patologias cardíacas como hipertensão, hipertrofia e infarto, o que possibilitará o desenvolvimento de novas drogas e terapias.

### Perspectivas do CEDEME

O objetivo do laboratório de produção de animais transgênicos do CEDEME é ser um fornecedor de modelos geneticamente modificados para todos os pesquisadores do Brasil e da América Latina, bem como manter as linhagens transgênicas em condições isentas de patógenos específicos (SPF). A próxima etapa a ser conquistada é a implantação das técnicas de cultivo e transfecção de células-tronco, as quais possibilitarão a geração de animais *knockin* e *knockout*. Além disso, estará disponível em pouco tempo o congelamento de embriões, uma ferramenta extremamente importante que possibilita a salvaguarda de todas as linhagens convencionais e transgênicas geradas no próprio Centro ou adquiridas do exterior. Essa técnica representará ainda uma economia considerável em termos de espaço físico para a manutenção das diferentes cepas de animais presentes no Centro.

### Referências bibliográficas

- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., Smithies, O. (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330(6148):576-578.
- Fukamizu, A. (1993) Transgenic animals in endocrinological investigation. *J Endocrinol Invest* 16(6):461-



**Figura 5.** Esquema da construção de DNA utilizada para a geração do camundongo Vitor, contendo o promotor da cadeia leve da miosina e o gene do receptor B2 das cininas de rato. Na parte inferior da figura, está mostrado um *Southern blot* utilizado para a detecção específica do gene B2 das cininas do rato (BKB2)

- 473.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12):7380-7384.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., Kemler, R. (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(23):9065-9069.
- Gavrilova, T.N. (1967) The contents of labeled DNA in nerve cells of mice of different ages after introduction of H<sup>3</sup>-thymidine in the period of embryogenesis. *Tsitologiya* 9(1):68-72.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E. Jr., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315(6021):680-683.
- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P., Taurog, J.D. (1990) Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63(5):1099-1112.
- Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E. (1986) *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Jaenisch, R. (1976) Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(4):1260-1264.
- Jaenisch, R. (1977) Germ line integration of moloney leukemia virus: effect of homozygosity at the *mmuIV* locus. *Cell* 12(3):691-696.
- Jaenisch, R., Mintz, B. (1974) Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(4):1250-1254.
- Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G., Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57(5):717-723.
- Loyter, A., Zakai, N., Kulka, R.G. (1975) Ultramicroinjection of macromolecules or small particles into animal cells. A new technique based on virus-induced cell fusion. *J Cell Biol* 66(2):292-304.
- Mullins, J.J., Peters, J., Ganten, D. (1990) Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344(6266):541-544.
- Nagano, M., Brinster, C.J., Orwig, K.E., Ryu, B.Y., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (2001) Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23):13090-13095.
- Niemann, H., Kues, W.A. (2000) Transgenic livestock: premises and promises. *Anim Reprod Sci* 60(61):277-293.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., Evans, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Biotechnology* 24:429-433.
- Pursel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., Bolt, D.J., Campbell, R.G., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E. (1989) Genetic engineering of livestock. *Science* 244(4910):1281-1288.
- Richa, J., Lo, C.W. (1989) Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected chromosome fragments. *Science* 245(4914):175-177.
- Rulicke, T., Hubscher, U. (2000) Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp Physiol* 85(6):589-601.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3):503-512.
- Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., Mcknight, R.A., Pittius, C.W., Henninghausen, L. (1991) High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5):1696-1700.
- Wood, S.A., Pascoe, W.S., Schmidt, C., Kemler, R., Evans, M.J., Allen, N.D. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10):4582-4585.