

TRANSGÊNESE EM CAPRINOS

[Transgenesis in goats]

Vicente J.F. Freitas^{1*}, Luciana M. Melo¹, Ribrio I.T.P. Batista¹, Joanna M.G. Souza-Fabjan¹, Dárcio I.A. Teixeira¹

¹ Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará; *Autor para correspondência: vicente.freitas@uece.br

RESUMO: Entre todos os mamíferos transgênicos produzidos até hoje, a espécie caprina tem representado um excelente modelo em transgênese quando são considerados os fatores como a demanda do mercado para a proteína, o volume de leite produzido por lactação e as taxas reprodutivas. Várias proteínas recombinantes foram obtidas a partir de cabras transgênicas, e entre estas, a antitrombina humana, foi a primeira proteína recombinante de origem animal a ser aprovada como um medicamento para a utilização clínica em seres humanos. Esta revisão tem por objetivo apresentar o estado-da-arte em caprinos transgênicos dando especial ênfase aos resultados obtidos por nosso grupo.

Palavras-Chave: *Capra hircus*; engenharia genética; leite; proteína recombinante.

ABSTRACT: Among all the transgenic mammals produced so far, goats have represented an excellent model of transgenesis when considering the factors such as the market demand for protein, volume of milk produced per lactation and reproductive rate. Various recombinant proteins have been obtained from the transgenic goats, and among these, human antithrombin was the first recombinant protein of animal origin to be released as a drug for the clinical use in humans. This review aims to present the state-of-the-art in transgenic goats with special emphasis on results obtained by our group.

Keywords: *Capra hircus*; genetic engineering; milk; recombinant protein.

INTRODUÇÃO

Proteínas humanas têm sido utilizados na medicina mundialmente e, durante algum tempo, o seu fornecimento foi limitado devido às poucas fontes para a sua extração (Clark, 1998). Com o advento da genética engenharia, essa realidade mudou, pois genes de interesse podem ser isolados, inseridos em vetores de expressão e transferidos para células ou organismos que podem, dessa forma, serem transformados em produtores de proteínas em escala industrial (Houdebine, 2003). As primeiras tentativas de produção de proteínas de valor terapêutico a partir de genes clonados foram em microrganismos. No entanto, dessa maneira, algumas proteínas humanas são sintetizadas apenas em pequenas quantidades, outras tornam-se insolúveis fazendo sua purificação de difícil realização. Além disso, os produtos podem apresentar-se como imunogênicos ou com pouca atividade biológica devido ao processamento pós-traducional incorreto (Kues & Niemann, 2004).

Desde 1982, com o nascimento do primeiro mamífero (camundongo) expressando níveis elevados do hormônio do crescimento humano (Palmiter et al., 1982), verificou-se que os animais

podiam ser utilizados como biorreatores. Posteriormente, vários animais transgênicos foram obtidos em diferentes espécies: coelhos, suínos e ovinos (Hammer et al., 1985), caprinos (Ebert et al., 1991) e bovinos (Krimpenfort et al., 1991).

De acordo com Clark (1998), para a produção de proteínas recombinantes, alguns aspectos devem ser considerados na escolha da espécie como reator biológico, como a demanda do mercado pela proteína, o volume de leite produzido por lactação e as taxas de reprodução da espécie. De todos os biorreatores mamíferos já produzidos, os caprinos (*Capra hircus*) representam um excelente modelo para transgênese, já que a produção de animais fundadores e custos operacionais são significativamente mais fáceis de gerenciar em comparação com bovinos, por exemplo.

Neste manuscrito serão apresentados os aspectos inerentes à produção de caprinos transgênicos. Além disso, uma ênfase especial será dada aos resultados do nosso grupo na obtenção de caprinos transgênicos para o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano (hG-CSF).

MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE CAPRINOS TRANSGÊNICOS

Caprinos transgênicos já foram obtidos por microinjeção pronuclear e transferência nuclear de células somáticas (TNCS). As principais etapas dessas duas técnicas são apresentadas na Figura 1.

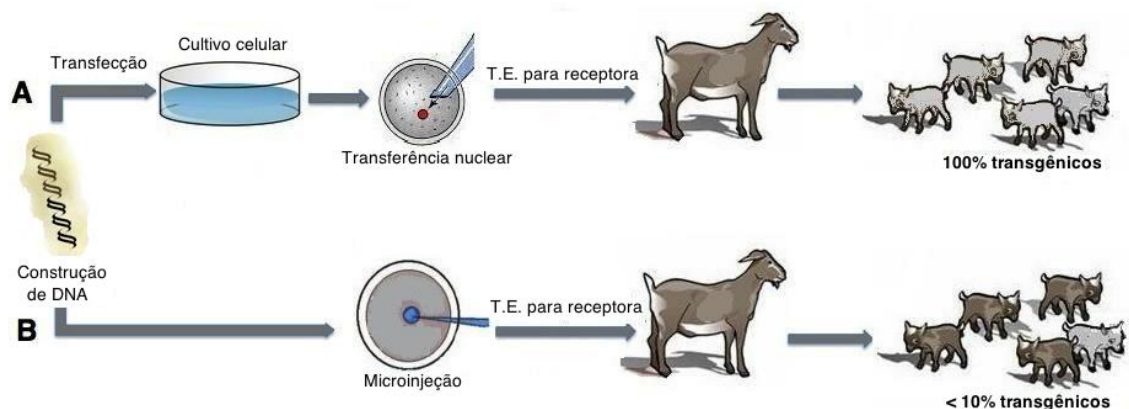
A microinjeção pronuclear é o método tradicional para a produção de caprinos transgênicos e consiste na microinjeção de uma construção gênica (gene de interesse + gene de expressão em glândula mamária) em um dos pró-núcleos do embrião recém-fecundado. A microinjeção pronuclear é realizada em microscópio invertido munido de micromanipuladores. Uma micropipeta contendo a construção de DNA (cerca de 500-5000 cópias em 1-2 pL) penetra na zona pelúcida e a injeção é realizada em um dos pró-núcleos (Houdebine, 2003). A microinjeção deve ser realizada entre 15 e 20 h após a provável fecundação. Além disso, devido à grande quantidade de gotas lipídicas no citoplasma, os embriões caprinos devem ser primeiramente submetidos à uma centrifugação. No entanto, a microinjeção pronuclear é um método que apresenta uma baixa eficiência e, geralmente, menos de 10% da prole é transgênica (Baldassarre & Karatzas, 2004).

A TNCS, combinada com técnicas de biologia molecular e celular, mostra uma variedade de

aplicações. Entre as diferentes áreas, a transgênese é, possivelmente, a que mais se beneficiou com os avanços nesta biotécnica, no sentido de aumentar a eficácia e reduzir os custos. Desde o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997), a tecnologia de TNCS continua praticamente a mesma e consiste na transferência de núcleo de células doadoras (carioplastos) para oócitos enucleados (citoplastos) com reconstrução posterior do embrião através da fusão celular. A TNCS pode produzir animais transgênicos através da transfecção de núcleos com vetores de DNA ou através da clonagem de animais transgênicos fundadores (Baldassarre & Karatzas, 2004).

No método de TNCS, utilizando a transfecção de núcleos, o DNA exógeno é incorporado aleatoriamente no genoma utilizando pressão seletiva. Além disso, as células transgênicas podem ser completamente caracterizadas com relação ao local de integração, o número de cópias integradas e integridade do transgene antes da etapa de transferência nuclear propriamente dita. Embora a capacidade para desenvolvimento dos embriões reconstruídos é baixa, a maioria da descendência é transgênica, o que torna esta técnica muito mais eficiente do que a microinjeção pronuclear (Behboodi et al., 2005).

Figura 1. Métodos para a produção de caprinos transgênicos: A) transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e B) microinjeção pronuclear.



A GLÂNDULA MAMÁRIA COMO BIORREATOR

A glândula mamária é uma glândula cutânea de característica apócrina/exócrina, com composição túbulo-alveolar e suas unidades secretoras consistem de alvéolos que levam a pequenos ductos excretórios. Os grupos de unidades secretoras formam lóbulos que são posteriormente agrupados

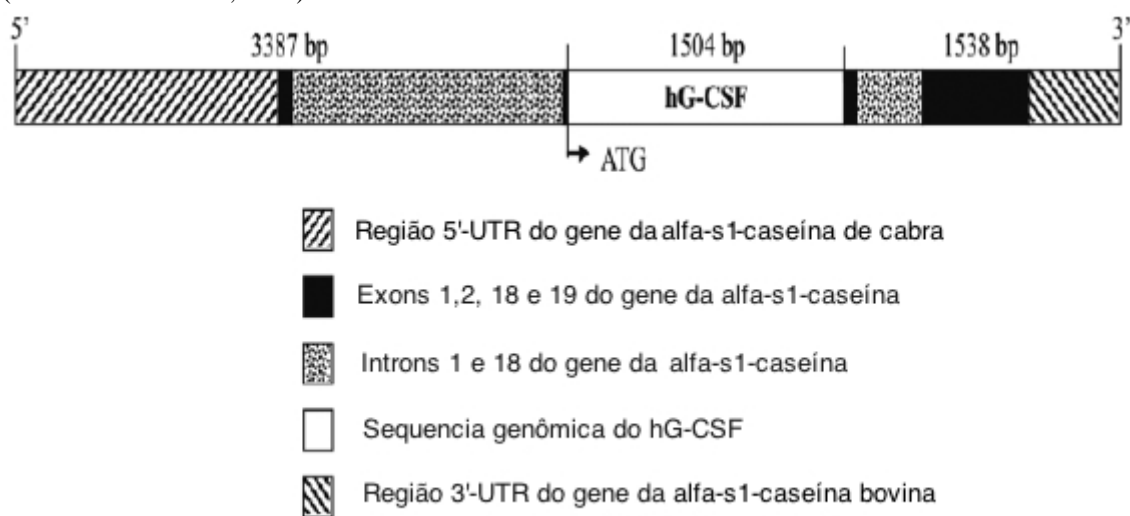
em estruturas maiores chamadas lobos, formando o parênquima mamário.

Os alvéolos são as unidades secretoras fundamentais de leite e são compostos por células epiteliais capazes de sintetizar as gorduras, carboidratos e proteínas, expulsando o produto para o interior do lúmen dos alvéolos. As proteínas secretadas pela glândula mamária são agrupadas em

duas classes, caseínas e proteínas do soro. De acordo com Park et al. (2007), os ruminantes secretam principalmente quatro caseínas (α S1, α S2, β e κ) e duas proteínas séricas (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Os genes que codificam estas proteínas estão em cópias simples e são transcritos a níveis elevados, em especial durante a prenhez e lactação (Clark, 1998). Assim, trabalhos pioneiros nos anos 1980 exploraram a capacidade da produção de proteínas recombinantes no leite de animais transgênicos (Gordon et al., 1987;

Simmons et al., 1987). Assim, promotores e regiões regulatórias de genes específicos para proteínas do leite foram utilizados para direcionar a expressão do gene na glândula mamária (Maga & Murray, 1995). Um exemplo dessas construções, com objetivo de secretar proteínas recombinantes no leite, pode ser visualizado na Figura 2, e foi utilizado na obtenção de camundongos e caprinos transgênicos para o hG-CSF.

Figura 2. Construção gênica para direcionar a expressão do hG-CSF no leite de camundongos e caprinos (Dvorianchikov et al., 2005).



Como explicitado anteriormente, vários caprinos transgênicos já foram obtidos em diferentes laboratórios ao redor do mundo, sendo que a

maioria foi planejada para a secreção de proteínas de valor terapêutico no leite desses animais (Tabela 1).

Tabela 1. Nível de expressão, do mais alto para o mais baixo, de proteínas humanas recombinantes secretadas no leite de caprinos transgênicos.

Proteína humana	Promotor	Nível de expressão (mg/mL)	Referência
Antitrombina	β -caseína caprina	0,09 – 12,5	Zhou et al., 2005
Butirilcolinesterase	β -caseína caprina	0,1 – 5,0	Huang et al., 2007
Lactoferrina	β -caseína caprina	0,77	Zhang et al., 2008
Lisozima	α -s1-caseína caprina	0,27	Maga et al., 2006
G-CSF	α -s1-caseína caprina/bovina	0,62	Freitas et al., 2012
G-CSF	β -caseína caprina	0,05	Ko et al., 2000
Fator IX	β -caseína bovina	$9,5 \times 10^{-5}$	Huang et al., 1998

RESULTADOS OBTIDOS NO BRASIL

O Brasil vem se apresentando como uma referência internacional na obtenção de caprinos transgênicos através de dois grupos localizados em Fortaleza (CE). O primeiro, pioneiro com trabalhos nesta espécie, é o grupo do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução-LFCR da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Este grupo obteve

caprinos transgênicos para o hG-CSF em duas ocasiões: 2006 e 2008 (Freitas et al., 2007; Freitas et al., 2012). Já o segundo grupo, do Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Este grupo obteve caprinos transgênicos para a lisozima (Bertolini, comunicação pessoal, 2012).

Nas pesquisas realizadas no LFCR foram utilizadas primeiramente cabras da raça Saanen. Em um segundo momento, objetivando agregar valor a uma raça naturalizada do Nordeste, utilizou-se cabras Canindé. Na comparação entre estas duas raças, foi verificada uma leve superioridade (não

significativa) dos caprinos naturalizados sobre os exóticos (Freitas et al., 2014), como pode ser observado na Tabela 2. Vale ressaltar que animais transgênicos foram obtidos somente com receptoras que receberam embriões oriundos de doadoras Canindé.

Tabela 2. Diagnóstico de prenhez, a sobrevivência embrionária e fertilidade ao parto de receptoras sem raça definida que receberam embriões previamente colhidos de doadoras Canindé e Saanen e microinjetados com uma construção de DNA.

Raça	Diagnóstico de prenhez 30 dias		Ao parto	
	Prenhes	Sobrevivência	Recep. parindo	Sobrevivência
Canindé	14/20 (70,0%)	20/61 (31,8%)	12/20 (60,0%)	18/61 (29,5%)
Saanen	5/12 (41,7%)	7/30 (23,3%)	3/12 (25,0%)	5/30 (16,7%)

Com os dois animais fundadores, obtidos por microinjeção pronuclear em 2008, o grupo realizou estudos para a caracterização fenotípica e genotípica desses animais. Um desses estudos foi o uso da indução hormonal da lactação na fêmea fundadora e a verificação do nível de expressão do hG-CSF no leite. Assim, foi observado, por dosagem ELISA que a fêmea fundadora produz em média (\pm DP) $620,92 \pm 179,93$ μ g/mL de leite. Esta produção é cerca de 10 vezes superior ao outro caprino transgênico para o hG-CSF obtido por pesquisadores sul-coreanos (Ko et al., 2000).

Adicionalmente, os dois animais obtidos neste experimento demonstraram ser verdadeiros fundadores, já que através de sua reprodução com caprinos não transgênicos foram obtidas crias transgênicas por herança mendeliana normal: 54,4% das crias do macho fundador foram transgênicas e 37,5% das crias da fêmea fundadora possuíam o gene exógeno (Freitas et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez obtidos os primeiros caprinos transgênicos no mundo, esta espécie tem sido utilizada como um modelo para a produção de proteínas recombinantes. Durante este tempo, mesmo após ter sido adquirido um conhecimento amplo dos vários aspectos que influenciam a produção de animais transgênicos, as taxas de sucesso continuam baixas. No entanto, várias proteínas para uso terapêutico em humanos foram produzidas, purificadas e caracterizadas.

No Brasil, com a produção dos primeiros caprinos transgênicos, espera-se que o mesmo possa juntar-se ao seleto grupo de países que dominam essa tecnologia e que seja possível reduzir os custos de produção de proteínas recombinantes de interesse em saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldassarre H. & Karatzas C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*. 82-83:255-266.
- Behboodi E., Ayres S.L., Memili E., O'coin M., Chen L.H., Reggio B.C., Landry A.M., Gavin W.G., Meade H.M., Godke R.A. & Echelard Y. 2005. Health and reproductive profiles of malária antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*.7:107-118.
- Clark A.J. 1998. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing and production of recombinant proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 3:337-350.
- Dvoriachikov G.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Dias L.P., Azevedo S. & Serov O.L. 2005. Secretion of biologically active human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in milk of transgenic mice. *Genetika*. 41:1331-1337.
- Ebert K.M., Selgrath J.P., Ditullio P., Denman J., Smith T.E., Memon M.A., Schindler J.E., Monastersky G.M., Vitale J.A. & Gordon, K. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)*. 9:835-838.
- Freitas V.J.F., Serova I.A., Moura R.R., Andreev, L.E., Melo L.M., Teixeira D.I.A., Pereira A.F., Lopes-Jr E.S., Dias L.P.B., 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. 2012. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*. 105:105-113.
- Freitas V.J.F., Serova I.A., Andreeva L.E., Melo L.M., Teixeira D.I.A., Pereira A.F., Moura R.R., Lopes-Jr E.S., Souza-Fabjan J.M.G., Batista R.I.T.P. & Serov O.L. 2014. The comparison of two embryo donor breeds for the generation of transgenic goats by DNA pronuclear microinjection. *Animal Production Science*. 54:564-568.
- Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H. & Hennighausen L. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnology (NY)*, 24:425-428.
- Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., 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*. 315:680-683.

- Houdebine, L.M. 2003. From the gene to the transgenic animal. In: *Animal Transgenesis and Cloning*. West Sussex: Wiley, 1-32.
- Huang S., Zhang K., Huang Y., Chen M., Li H., Lu D., Lu J., Chen Y., Qiu X., Xue J. & Zeng Y. 1998. Secretion of biological active human IX protein in the milk of transgenic goats. *Chinese Science Bulletin*. 43:1317-1319.
- Huang Y.J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc, M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., Touati M., Turcotte C., Valeanu L., Lemée N., Wilgus H., Bégin I., Bhatia B., Rao K., Neveu N., Brochu E., Pierson J., Hockley D.K., Cerasoli D.M., Lenz D.E., Karatzas C.N. & Langermann, S. 2007. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 104:13603-13608.
- Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., Van Der Schans A., Van Den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R. & De Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology* (NY). 9:844-847.
- Ko J.H., Lee C.S., Kim K.H., Pang M.G., Koo J.S., Fang N., Koo D.B., Oh K.B., Youn W.S., Zheng G.D., Park J.S., Kim S.J., Han Y.M., Choi I.Y., Lim J., Shin S.T., Jin S.W., Lee K.K. & Yoo O.J. 2000. Production of biologically active human granulocyte colony-stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Research*. 9:215-222.
- Kues W.A. & Niemann H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends in Biotechnology*. 22:286-294.
- Maga E.A. & Murray J.D. 1995. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology* (NY). 13:1452-1457.
- Maga E.A., Cullor J.S., Smith W., Anderson G.B. & Murray J.D. 2006. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3:384-392.
- 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. *Nature*. 16:611-615.
- Park Y., Juárez M., Ramos M. & Haenlein G. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68:88-113.
- Simmons J.P., Mcclenaghan M. & Clark A.J. 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*. 328:530-532.
- Zhang J., Li L., Cai Y., Xu X., Chen J., Wu Y., Yu H., Yu G., Liu S., Zhang A. & Chen J. & Cheng G. 2008. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expression and Purification*. 57:127-135.
- Zhou Q., Kyazike J., Echelard Y., Meade H.M., Higgins E., Cole E.S. & Edmunds, T. 2005. Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats. *Journal of Biotechnology*. 117:57-7.