

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0903975-9 A2**

(22) Data de Depósito: 06/03/2009
(43) Data da Publicação: 11/01/2011
(RPI 2088)



★ B R P I 0 9 0 3 9 7 5 A 2 ★

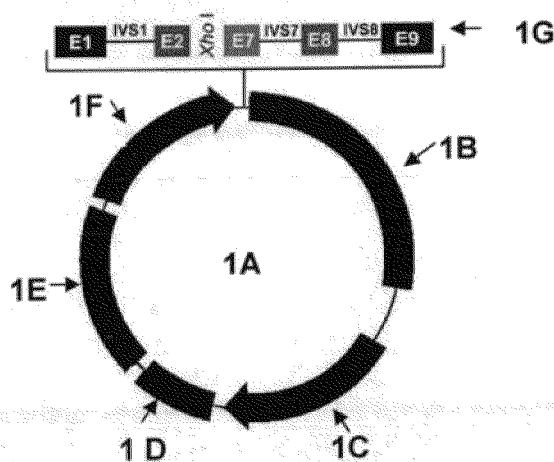
(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/64
C07K 1/107
C07K 14/745
C12N 5/0735

(54) Título: **PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GERADAS POR CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS MODIFICADAS**

(73) Titular(es): Sharon Lisauskas Ferraz de Campos

(72) Inventor(es): Sharon Lisauskas Ferraz de Campos

(57) Resumo: PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GERADAS POR CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS MODIFICADAS. A presente invenção está relacionada ao processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas e processo de purificação de proteínas geradas por células-tronco modificadas. Em especial, a presente invenção se situa no campo da terapêutica médica e veterinária.





Relatório Descritivo

PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GERADAS POR CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS MODIFICADAS.

5

Campo da Invenção

A presente invenção está relacionada ao processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas e processo de purificação de proteínas geradas por células-tronco modificadas. Em especial, a presente invenção se situa no campo da terapêutica médica e veterinária.

10

Antecedentes da Invenção

A crescente demanda por biomoléculas de interesse farmacológico tem levado ao desenvolvimento de sistemas adicionais para a produção de proteínas recombinantes em larga escala e sob custos mais reduzidos. Sistemas de expressão utilizando células de procariotos e de eucariotos superiores vêm sendo apontados como possíveis alternativas para a produção de proteínas de interesse farmacológico (Leite, 2000). A secreção desses polipeptídeos no leite de animais transgênicos também possibilita não apenas altos rendimentos de produção de fármacos heterólogos como também a ocorrência de seu processamento e modificações pós-traducionais de maneira correta (Kerr *et al.*, 1996). De maneira complementar, a produção desse tipo de biomolécula em sistemas eucariotos tem apresentado características interessantes tanto com relação à manutenção de seu processo de síntese, enovelamento e processamento, quanto à significativa redução de custos, aumento de estabilidade, manutenção de atividade biológica e ausência de contaminantes e patógenos comuns aos humanos (Kusnadi *et al.*, 1997). O fator IX (FIX) de coagulação sanguínea é um exemplo prático dessa produção heteróloga, em que foi comprovada a detecção do fator IX recombinante e biologicamente ativo quando produzido no leite de camundongas transgênicas

15

20

25

30

(Lisauskas et al., 2008). Camundongas transgênicas *Mus musculus* foram desenvolvidas como modelo experimental no Brasil transformadas com o gene humano do *fator IX de coagulação sangüínea*. As camundongas secretaram no leite o FIX recombinante. Testes de atividade da proteína recombinante em amostras de sangue de pacientes hemofílicos do tipo B foram realizados com auxílio de coagulômetro, comprovando a bioatividade da proteína. A expressão do fator IX humano de coagulação sangüínea biologicamente ativa em camundongas transgênicas (Eyestone, 1994; Lisauskas et al., 2008) justifica a aplicabilidade do uso de sistemas heterólogos eucarióticos, utilizados como biofábricas para a produção constante, em larga escala e sob custos mais reduzidos de proteínas humanas, limitadas pela escassez de suprimentos biológicos, ou seja, de matéria-prima inicial para a posterior purificação dessas proteínas.

Os primeiros sucessos da utilização da tecnologia do DNA recombinante na produção de proteínas em sistemas heterólogos têm sido demonstrados por meio da produção comercial de hormônios e vacinas em microrganismos e/ou células em cultura. Proteínas humanas, dentre elas, insulina, anticorpos, eritropoietina, fator VIII, fator IX etc, podem ser produzidas em sistemas “artificiais” e substitutivos às técnicas de purificação a partir de compostos humanos. Esses sistemas podem funcionar como uma constante cadeia de produção de novos fármacos associados a proteínas humanas recombinantes. Apesar de eficientes, esta estratégia possui algumas limitações intrínsecas. Entre estas, a principal está na impossibilidade de produção em larga escala. Isto se deve principalmente porque os fermentadores contêm um limitado número de células, as quais são mantidas em condições metabólicas sub-ótimas. Fermentadores com alta capacidade podem produzir proteínas recombinantes em larga escala, mas não a baixo custo.

Na tentativa de avanços tecnológicos na área de produção de recombinantes, surgiram tecnologias adicionais para a produção de proteínas de valor farmacêutico em que os sistemas heterólogos se restringiam à cultura de células de mamíferos *in vitro* ou produção em microorganismos. A partir da

década de 90, a utilização de animais transgênicos tem demonstrado ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em larga escala e custo reduzido (Houdebine, 1994; Wall, 1996)

5 A utilização de um camundongo transgênico expressando uma proteína recombinante validou a hipótese da utilização de animais como biorreatores (Palmiter et al., 1982; Choo et al., 1987; Lissauskas et al., 2008). Para a produção em larga escala, a demonstração foi dada em 1987, através de um ovino produzindo beta-lactoglobulina (Simons et al., 1987). Estes resultados foram confirmados por meio da produção experimental de dezenas de
10 proteínas recombinantes no leite de diferentes espécies animais (Clark, 1998; Wall, 1999; Rudolph, 1999).

A possibilidade em se utilizar células animais somáticas transfectadas (Felgner et al., 1989; Egilmez et al., 1996; Friend et al., 1996; Oliveira et al., 2005; Iguma et al., 2005) como doadoras de núcleos para a transferência
15 nuclear abriu uma nova perspectiva prática e viável para a geração de bovinos transgênicos (Carver et al., 1993). McCreath et al. (2000) produziram um ovino transgênico a partir da transferência nuclear de fibroblastos fetais, transformados com o vetor linearizado COLT-2, o qual induziu a expressão da proteína alfa-antitripsina no leite de ovelhas. Entretanto, muitos desafios
20 técnicos ainda necessitam ser superados e os processos precisam ser desenvolvidos e otimizados na área da transferência nuclear, introdução no genoma e expressão dos transgenes a nível desejado (Palmiter et al., 1982; Simons et al., 1987; Clark, 1998; Wall, 1999; Rudolph, 1999; Lissauskas et al., 2007).

25 A fim de aperfeiçoar o processo de geração de bovinos transgênicos, Saito et al. (2003) e Li Wang et al. (2005) modificaram geneticamente células-tronco embrionárias bovinas e conseguiram resultados superiores na produção e desenvolvimento de embriões após a transferência nuclear, quando comparado com a utilização de células somáticas (fibroblastos) geneticamente
30 modificadas como doadoras de núcleos transgênicos.

A saúde pública é um dos principais focos da biotecnologia por meio do uso da engenharia genética na produção de bioprodutos, alimentos com características nutracêuticas, bioinseticidas, vacinas de DNA, e proteínas recombinantes humanas obtidas a partir de sistemas alternativos de produção.

- 5 Atualmente, a expectativa de vida dos brasileiros tende a aumentar devido aos avanços da biotecnologia na medicina, por meio de diagnósticos precoces de doenças letais; na agropecuária, por meio do aumento da produtividade nas áreas de plantio e por meio do melhoramento genético de rebanhos comerciais; e na indústria, por meio do desenvolvimento de novos fármacos com aplicação
- 10 na área médica, fazendo com que fatores limitantes, como suprimentos de plasma e de compostos biológicos humanos, sejam supridos pelos sistemas alternativos de produção de fármacos.

- Um animal transgênico, segundo a definição da Federação Européia das Associações de Ciência em Animais de Laboratório, é "um animal que possui
- 15 seu genoma modificado artificialmente pelo homem, quer por meio da introdução, quer da alteração ou da inativação de um gene (uma seqüência definida de DNA). Esse processo deve culminar na alteração da informação genética contida em todas as células desse animal, até mesmo nas células germinativas (óvulos e espermatozóides), fazendo com que essa modificação
- 20 seja transmitida aos descendentes".

- O método mais utilizado para introdução de genes é a transgenia por adição, por meio do qual é inserida no genoma uma ou várias cópias de um gene de interesse - daí suas outras denominações: adição gênica e modelo de superexpressão de genes. O gene adicionado pode ser endógeno ou exógeno.
- 25 O primeiro tipo já existe no genoma do animal. Este é usado quando se quer produzir uma quantidade maior da proteína codificada já existente, aumentando a quantidade de sua cópia no genoma. Genes exógenos pertencem à outra espécie e são usados para fazer um animal produzir uma nova proteína, ausente na forma desejada na espécie receptora.

- 30 Os primeiros sucessos da utilização da tecnologia do DNA recombinante na produção de proteínas em sistemas heterólogos, foram demonstrados por

meio da produção comercial de hormônios e vacinas em microrganismos e/ou células em cultura. Entretanto, existem limitações para a produção de algumas proteínas recombinantes em sistemas bacterianos devido ao não processamento pós-traducional de maneira a produzir moléculas biologicamente ativas. Em outros casos, as proteínas de interesse estão em forma de agregados, e não podem ser facilmente recuperadas. Como opção, diferentes proteínas recombinantes têm sido produzidas em células animais. Fermentadores contendo hibridomas, células CHO entre outros, têm sido extensivamente utilizados para a produção de anticorpos contra Hepatite B, eritropoietina, fator VIII etc. Apesar de eficientes, esta estratégia possui algumas limitações intrínsecas. Dentre estas, a principal está na impossibilidade de produção em larga escala. Isto se deve principalmente porque os fermentadores contêm um limitado número de células, as quais são mantidas em condições metabólicas sub-ótimas. Fermentadores com alta capacidade podem produzir proteínas recombinantes em larga escala, mas não a baixo custo.

Na tentativa de avanços tecnológicos na área de produção de proteínas recombinantes, surgem tecnologias adicionais para a produção de proteínas de interesse econômico em larga escala de produção. Animais transgênicos (Wall, 1996; Houdebine, 1994) e plantas transgênicas (Kusnadi et al., 1997; Leite et al., 2000.) têm demonstrado ser altamente eficientes para a produção de proteínas recombinantes biologicamente ativas, em larga escala e sob custos mais reduzidos.

A utilização de um camundongo transgênico expressando uma proteína recombinante validou a hipótese da utilização de animais como biorreatores (Lisaukas et al., 2008; Choo et al., 1987; Simons et al., 1987; Palmiter et al., 1982). Para a produção em larga escala, a demonstração foi dada em 1993, por meio da produção de proteínas recombinantes na espécie ovina (Carver et al., 1993; Wright and Colman, 1997). Estes resultados foram confirmados por meio da produção experimental de dezenas de proteínas recombinantes no

leite de diferentes espécies animais (Rudolph, 1999; Clark, 1998; Wall, 1999; Eyestone, 1994).

O leite contém proteínas que são naturalmente expressadas pela glândula mamária durante a lactação. As duas principais categorias de proteínas produzidas no leite envolvem as caseínas e proteínas solúveis. Os genes codificantes para algumas destas proteínas foram clonados e os elementos reguladores que controlam os locais de expressão tecido-específico e temporal foram caracterizados. Em nosso vetor de expressão construído, a sequência codificante do gene de interesse, o gene do *fator IX humano de coagulação sangüínea*, foi construída ligada a um promotor que direcionou a expressão do produto gênico para as glândulas mamárias de camundongas. Neste projeto, o Laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) – Brasília – DF, em parceria com a Universidade de Brasília – UnB e a Universidade Federal Paulista – UNIFESP, desenvolveram camundongas transgênicas expressando o fator IX de coagulação humana no leite. Os camundongos geneticamente modificados foram produzidos com base na técnica de microinjeção do vetor de expressão diretamente nos pró-núcleos masculinos, gerando linhagens germinativas geneticamente modificadas (Lisaukas et al., 2008). Estudos foram conduzidos para avaliar a presença do transgene introduzido tanto na matriz quanto na progênie, utilizando PCR e *southern blot*, além de análises da expressão do fator no leite das camundongas (*western blot*). A validação desse sistema heterólogo por meio da produção dessa proteína recombinante foi confirmada por ensaios de bioatividade da proteína recombinante purificada do leite, demonstrando sua atividade e a capacidade de coagulação da proteína (fator IX humano) em sangue de pacientes hemofílicos. O Hospital de Apoio de Brasília foi o responsável pelos bioensaios da proteína recombinante.

Após a validação do sistema heterólogo de produção de proteínas recombinantes no leite dos animais gerados como modelos experimentais, o próximo passo foi atingir a produção em larga escala. Células animais transfectadas e devidamente caracterizadas têm sido utilizadas como fontes

doadoras de seus núcleos para a síntese de proteínas em animais de grande porte. Neste contexto, as espécies de caprinos e bovinos são candidatas importantes para a produção de proteínas recombinantes devido à alta capacidade de produção de leite e conseqüentemente de proteína recuperada (McCreath et al., 2000; Yull et al., 1997).

A possibilidade de se utilizar células animais somáticas transfectadas – fibroblastos bovinos - (Iguma et al., 2005; Egilmez et al., 1996; Friend et al., 1996; Felgner et al., 1989) como doadoras dos núcleos para a transferência nuclear abriu uma nova perspectiva para a geração de bovinos e ovinos transgênicos (Cibelli et al., 1998; Carver et al., 1993). McCreath et al. (2000) produziram um ovino transgênico a partir da transferência nuclear de fibroblastos fetais, transformados com o vetor linearizado COLT-2, o qual induziu a expressão da proteína alfa-antitripsina no leite de ovelhas.

Entretanto, muitos desafios técnicos ainda necessitam ser superados e os processos precisam ser desenvolvidos e otimizados nas áreas de: células de eleição como doadoras dos núcleos transgênicos para a transferência nuclear; introdução no genoma e expressão dos transgenes a nível desejado; aumento das taxas de embriões reconstruídos e as taxas de gestação de embriões transgênicos (Lisaukas et al., 2007; Iguma et al., 2005; Rudolph, 1999; Wall, 1999; Clark, 1998.) O conhecimento dos fenômenos envolvidos na integração e na segregação de genes exógenos em animais transgênicos, principalmente nos de grande porte, é fundamental para o futuro controle destes processos (Stinnakre et al., 1999).

A fim de aperfeiçoar o processo de geração de bovinos transgênicos, Saito et al. (2003) modificaram geneticamente células-tronco embrionárias bovinas e conseguiram resultados superiores na produção e desenvolvimento de embriões após a transferência nuclear, quando comparado com a utilização de células somáticas (fibroblastos) geneticamente modificadas como doadoras de núcleos transgênicos.

O presente trabalho propôs a modificação genética de células bovinas para serem modelos de estudos para a futura geração de linhagens de células

doadoras aptas à produção de bovinos transgênicos. Com base na estratégia da transfecção de fibroblastos isolados de tecido adulto (Oliveira et al., 2005; Oleskovicz et al., 2004), foram geradas linhagens celulares bovinas MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) com inserções não-deletérias do transgene e variáveis níveis de expressão (Fujiwara et al., 1999; Fujiwara et al., 2003; Forsbach et al., 2003; Lisauskas et al., 2007). Os sítios de integração dos transgenes nos cromossomos que propiciam sua expressão não estão bem caracterizados, mas acredita-se ser regiões transcricionalmente ativas da eucromatina (Day et al., 2000). No estado de heterocromatina os fatores transcripcionais são inacessíveis, e freqüentemente está relacionado à hipermetilação por citosinas e à hipoacetilação pelas histonas (Ng and Bird, 1999). A consequência direta desta configuração da cromatina é que transgenes que se integram randomicamente às proximidades da heterocromatina freqüentemente apresentam níveis mais baixos de expressão (Dobie et al., 1996). Com os estudos feitos neste trabalho, foi possível estabelecer linhagens clones transfectadas de células MDBK bovinas, gerando eventos elites quanto ao local de integração do transgene no genoma, e quanto à detecção da expressão estável destes transgenes nessas linhagens. A aplicação futura dessa caracterização pode funcionar como modelo de integração de outros vetores de expressão no genoma bovino, utilizando-se genes-alvo ("gene targeting"), para a transformação genética das células doadoras de núcleos transgênicos para a reconstrução embrionária após a transferência nuclear. Segundo Iguma et al. (2005) a transferência de núcleo baseia-se na geração de animais transgênicos com genótipo preestabelecido. Os animais clones bovinos são produzidos a partir de células geneticamente modificadas, utilizadas como fontes doadoras de núcleos transformados e microinjetadas em ovócitos previamente enucleados. O embrião transgênico gerado segue para a transferência em vacas receptoras (Cibelli et al., 1998; Schnieke et al., 1997; Campbell et al., 1996).

Entretanto, a fim de aumentar a eficiência de produção de embriões transgênicos reconstruídos após a transferência nuclear (TN) e aumentar as

taxas de prenhez desses embriões, deve ser utilizada a estratégia da transfecção de células-tronco isoladas de embriões bovinos (Li Wang et al., 2005). Segundo Saito et al. (2003) sete embriões provenientes de células-tronco geneticamente modificadas foram transferidos para sete animais receptores e cinco fetos (71%) foram confirmados. A taxa de frequência de gestação (71%) e de animais nascidos provenientes de blastocistos derivados de células-tronco geneticamente modificadas foram maiores que as taxas de gestações geradas a partir de células somáticas (aproximadamente 55%), reportadas após a TN. O desenvolvimento dos sistemas para a geração de bovinos transgênicos (Saito et al., 2003; Li Wang et al., 2005) visam ao aprimoramento da produção de embriões transgênicos utilizando células-tronco embrionárias bovinas como doadoras de núcleos geneticamente modificados. No nosso estudo, foram estabelecidas cinco colônias de células-tronco embrionárias bovinas para serem futuramente transfectadas *in vitro*, e funcionarem como fontes doadoras de núcleos transgênicos, a fim de aumentar tanto as taxas de reconstrução embrionária pós-TN, quanto às taxas gestacionais pós-transferência de embriões (TE).

A utilização de animais transgênicos deverá permitir a expressão de proteínas com estruturas complexas, estabilidade e atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, consistência da produção entre os diferentes animais e entre gerações, além de possibilitar a produção de algumas proteínas que ainda não foram produzidas utilizando outros sistemas. Pode-se conseguir uma eficiente produção de dezenas de gramas da proteína recombinante por litro de leite, chegando a quilogramas por ano. Um aumento de produtividade entre 10-1000 vezes, produção em larga escala de maneira mais econômica, e reduzido investimento quando comparado aos sistemas de células em cultura. Sistemas de produção que utilizam células em cultura podem produzir no máximo 1-2 gramas, ou mais tipicamente 100-200 mg por litro por dia (Wright and Colmann, 1997; Van Cott et al., 1996; Denman et al., 1991; Gordon et al., 1987). Comparando-se com uma cabra: sua produção diária de leite é tipicamente 2-4 litros, contendo 10 ou mais gramas de proteína recombinante por litro, podendo

esta prover mais matéria prima de proteína recombinante do que um biorreator de 1000 litros (Denman *et al.*, 1991).

Atualmente, a utilização de animais transgênicos tem demonstrado ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em
5 larga escala e custos mais reduzidos, os quais têm recebido aceitação pelas agências de regulamentação responsáveis pela produção de fármacos. As principais plataformas tecnológicas existentes em relação à utilização de animais como biofábricas estão restritas a alguns Institutos de Pesquisa e Empresas Privadas situados nos Estados Unidos e Europa. Na Argentina,
10 cinco animais bovinos geneticamente modificados com o gene do hormônio de crescimento humano produzidos no leite foram gerados pela empresa privada Bio Sidus no período de 2002 a 2004. Segundo esta empresa, um único animal pode chegar a produzir 15 gramas de proteína por dia, e meio quilo por mês. Cada dose recebida por um paciente contém pouco mais de 1 mg de hormônio
15 de crescimento de máxima pureza. É fundamental o estabelecimento dos sistemas requeridos para a efetiva produção de proteínas recombinantes no leite de animais transgênicos na América Latina, como uma das estratégias tecnológicas.

A utilização de transgênicos para a produção de proteínas
20 recombinantes deverá prover uma fonte segura, renovável e efetiva para a produção de proteínas biologicamente ativas, as quais somente estariam disponíveis por meio da utilização de células do sangue, tecidos ou biorreatores. A utilização da tecnologia de transgênicos é especialmente atrativa para a produção de proteínas recombinantes necessárias em larga
25 escala. Isso se dá devido às unidades de dosagens requeridas, administrações múltiplas, aplicação em larga escala na população, ou necessidade de produção industrial. Além disso, a utilização de animais transgênicos permite expressar proteínas bioquimicamente complexas que não podem ser produzidas de forma economicamente viável em cultura de células. O
30 significativo baixo custo em capital e custos operacionais para a produção de

compostos não processados, fazem com que os transgênicos tenham um custo mais efetivo do que outros sistemas de produção de proteínas recombinantes.

Algumas das vantagens da produção de proteínas recombinantes utilizando transgênicos são: leite como fonte de matéria prima não processada
5 segura, abundante, renovável, de fácil obtenção e de boa aceitação pública; possibilidade da produção de proteínas heterólogas com estruturas complexas; estabilidade da proteína e atividade biológica *in vitro* e *in vivo*; produção consistente entre as diferentes gerações dos animais; eficiência de produção: dezenas de gramas da matéria prima por litro de leite, muitos quilogramas de
10 proteínas por animal (cabra, ovelha, bovino) por ano, níveis de produtividade de 10 a 1000 vezes maiores do que sistemas de células em cultura; recuperação e purificação da proteína em grandes quantidades e alta concentração da proteína na matéria prima inicial / kg de leite.

Neste contexto, a espécie bovina é a eleita para a produção de proteínas
15 recombinantes devido ao alto nível de produção de leite e proteína, ambos aceitos como fontes de dieta. O leite dos bovinos tem sido extensivamente caracterizado a nível bioquímico, fato que facilita o desenvolvimento das etapas subseqüentes para a purificação das proteínas recombinantes. Além disso, existe a possibilidade do desenvolvimento de espécies transgênicas para
20 aplicações específicas, como vacas para a produção em grande quantidade (toneladas) ou coelhos e camundongos para produção de pequenas quantidades de proteínas requeridas em menor escala, ou simplesmente como modelo de estudo para a expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos (Lisaukas et al., 2007).

25 A glândula mamária pode ser considerada atualmente o melhor biorreator disponível (Colman, 1996; Rudolph, 1999). Estudos extensivos têm demonstrado a possibilidade da produção de uma grande variedade de proteínas recombinantes no leite, muitas delas, sendo proteínas complexas, como: IGFI humano (Zinoveiva et al., 1998), hGH (Devinoy et al., 1994),
30 lisozima humana (Lee et al., 1998), lactoferrina humana (Platenburg et al., 1994), eritropoietina humana (Sohn et al., 1999), hormônio da paratireóide

humano (Rokkones et al., 1996). Estes exemplos demonstram a capacidade da glândula mamária para sintetizar, maturar e secretar proteínas recombinantes.

Em termos econômicos, existe um mercado global em expansão para diferentes classes de proteínas recombinantes expressas no leite. Algumas vezes a demanda excede 100 kg. O mercado anual para antitrombina III, utilizada no tratamento da deficiência (hereditária), é de aproximadamente 70 Kg, a um custo de US\$ 2000-6000 o grama, segundo a IMS America Ltd. (Plymouth Meeting, MA). No caso da alfa-antripsina, indicada para o tratamento da fibrose cística, o mercado se aproxima de US\$ 30-50 milhões, sendo que 350 Kg são utilizados somente nos Estados Unidos, de acordo com a IMS. Para as proteínas provenientes do plasma humano, fator VIII e IX, o mercado anual é de aproximadamente 5-10 kg. De acordo com World Federation of Hemophilia (Montreal, Canada), a venda atual de fator IX é de aproximadamente US\$190 milhões nos Estados Unidos. O Fator VIII é de aproximadamente US\$ 2 bilhões. O mercado potencial para os produtos mencionados tem sido limitado pelo suprimento de plasma. No Brasil, segundo o Hospital de Apoio de Brasília – DF, todo o fator que é comprado no país é importado. Um frasco do remédio custa cerca de US\$ 100, sendo que cada paciente chega a utilizar 20 frascos por semana.

A etapa final do processo, que consiste na purificação das proteínas recombinantes do leite geralmente não apresenta dificuldades particulares. Entre os possíveis contaminantes biológicos, os *prions* são os que podem apresentar problemas. Entretanto, existem evidências homologadas, inclusive pela World Health Organization, enfatizando que *prions* não têm sido detectados em associação com leite e sêmen (Rudolph, 1995; Ziomek, 1996). Além disso, recentemente, rebanhos produtores de proteínas recombinantes direcionados à comercialização requerem sistemas fechados de controle sanitário no intuito de erradicar as possíveis contaminações por *prions* provenientes desses animais controlados (Gavin, 2001).

Esta plataforma tecnológica deverá formar a base fundamental para a futura utilização de diferentes seqüências regulatórias e codificantes,

prospectadas e devidamente caracterizadas, por meio de projetos de análise genômica funcional e de proteomas. Como consequência direta, irá possibilitar um cenário de efetiva aplicação da manipulação da tecnologia do DNA recombinante para a geração de produtos em benefício da nossa sociedade.

5 Hemofilia no Brasil e no mundo

A Hemofilia é uma doença hemorrágica decorrente da incapacidade de o sangue coagular. Atinge o público masculino de qualquer grupo étnico na proporção de 1 a cada 10 mil nascidos. No Brasil, há cerca de 8 mil hemofílicos cadastrados, no entanto, pela falta de diagnóstico, existem pacientes ainda não identificados.

O sangue do hemofílico produz em quantidades insuficientes os fatores de coagulação como o Fator VII, o VIII e o IX, entre outros. Daí a necessidade de tomar aplicações venosas a fim de conter os sangramentos. Possuem ação eficaz no organismo por cerca de 12-24 h, de acordo com cada caso. A forma tradicional de reposição são os fatores de origem plasmática, ou seja, os produtos derivados das doações de sangue. No entanto, recentes pesquisas permitiram a descoberta de produtos não-derivados do sangue, também conhecidos com recombinantes, e com os mesmos efeitos terapêuticos.

A disponibilidade de concentrados de fatores de coagulação recombinantes tem permitido a realização de tratamentos eficazes para prevenção de sequelas da hemofilia sem incrementar o risco de contaminação viral outrora existente com a utilização de produtos derivados de sangue humano. A inclusão do medicamento livre de plasma humano é a única forma, atualmente disponível, para eliminar o risco de exposição a novos patógenos ainda não estudados ou desconhecidos.

Cabe ressaltar a contaminação em proporções catastróficas, no mundo inteiro, da infecção por HIV, que assolou grupos suscetíveis como a comunidade dos hemofílicos na década de 80. Vale, ainda, lembrar a existência de agentes infecciosos mais recentes como o “Creutzfeldt-Jakob”, relacionado à encefalopatia bovina espongiforme, conhecido por todos como a

doença da vaca louca. Destaque, também, para o vírus “influenza aviário H5N1”, causador da gripe do frango.

O risco de contaminação por patógenos transmitidos pelo plasma humano tem sido reduzido pelo investimento em tecnologias de inativação viral a fim de tornar as aplicações do medicamento menos arriscadas. No entanto, este processo onera o custo de produção e induz o parque fabril de fármacos a investir nos produtos recombinantes.

A incessante aplicação de recursos em pesquisa promove vantagem competitiva em poder do detentor do conhecimento. Inúmeros são os exemplos de quem investe elevada soma de recursos sobre determinada linha de pesquisa, para, em seguida, auferir lucros na venda de seus produtos, em licenças de uso ou outras formas de retorno do investimento. No caso específico, a pesquisa para o domínio da produção dos fatores recombinantes, tende a se tornar investimento plausível e compensador, uma vez que sejam levados em conta o seguinte:

1) as leis brasileiras não permite um acompanhamento eficaz do doador, limitando em quantidade e qualidade a matéria-prima(sangue humano), um fato que reduz o atendimento da demanda; cabe destacar que a oferta é limitada, também, em outros países;

2) o medicamento não derivado de sangue humano reduz, significativamente, a possibilidade de reações alérgicas, freqüentes em muitos paciente hemofílicos e que dificultam o tratamento, além de aumentar a segurança na infusão;

3) a melhora do tratamento de portadores de hemofilia é diretamente proporcional à quantidade de fator de coagulação ofertada, que pode ser incrementada com a inserção de recombinantes;

Isso posto, urge a necessidade de se buscar fontes alternativas de produção de recombinantes para contribuir no tratamento daquela coagulopatia, de ingressar em seleto grupo de domínio do conhecimento da química fina, de se valorizar o pesquisador brasileiro e alcançar a auto-suficiência.

Há uma pesquisa inédita no Brasil, por enquanto suspensa, que é a produção de Fator IX de coagulação recombinante de origem do leite de vaca. Demonstrou ser um Projeto viável, salvo contraprovas ainda não apresentadas, diante de outras pesquisas similares. É inédito no mundo. Sua produção em
5 escala industrial garante a autosuficiência do mercado nacional com possibilidade de exportação. Por ser considerado medicamento de alta tecnologia, o produto recombinante pode ser negociado livremente no mercado. Além do Fator IX, podem ser produzidos pela mesma tecnologia outros como o VII e o VIII. O clima, as condições ambientais e a tecnologia
10 alcançada pela agropecuária brasileira garantem oferta ilimitada da matéria-prima a ser industrializada.

Hemofilia é um distúrbio genético da coagulação que faz com que o sangue não forme um efetivo coágulo. Na ausência desse coágulo, injúrias internas e lacerações externas são incapazes de serem resolvidas de maneira
15 correta. Hemofilia A e B são herdadas geneticamente como distúrbios recessivos ligados ao sexo (Cromossomo X) e ocorre quase que exclusivamente em homens na ordem de 1 em cada 5000 nascidos nos Estados Unidos e Canadá. Aproximadamente 13,5 mil americanos têm hemofilia A (também denominada de hemofilia clássica), em que o fator VIII de
20 coagulação está ausente ou não é produzido em quantidades suficientes. Já 3,5 mil pessoas nos Estados Unidos têm hemofilia B (também denominada Christmas disease), em que o fator IX de coagulação está ausente ou não está presente em quantidades suficientes. No Canadá, cerca de 2000 pessoas têm hemofilia A e 450 têm hemofilia B. No Brasil, existe uma incidência estimada de
25 1 em cada 10000 habitantes, sendo que 85% dos pacientes têm hemofilia A e 15% têm hemofilia B.

Enquanto a hemofilia pode resultar de uma mutação genética espontânea, é mais freqüentemente apresentada como um distúrbio hereditário. Essa doença é causada por uma deleção ou uma mutação do gene
30 que modifica a habilidade do organismo de produzir quantidades suficientes de fatores para promoverem a coagulação. Esta cascata age por duas vias, e visa

à formação de um coágulo sempre que um vaso é lesado, impedindo que o sangue extravase pela lesão indefinidamente. As pessoas afetadas por esta doença não produzem um dos dois fatores importantes para que esta cascata seja eficaz, o fator VIII ou o fator IX. Assim, são incapazes de coagular o sangue.

Até hoje, o tratamento para esta doença é a injeção destes fatores que faltam (o VIII ou o IX), por meio de derivados do sangue de doadores sadios ou fabricados por engenharia genética. Estes fatores, porém, são muito instáveis, exigindo injeções freqüentes.

A hemofilia é caracterizada como grave quando a atividade do fator de coagulação implicado é menor do que 1% do normal. Isso freqüentemente resulta em sangramento espontâneo. A doença é leve quando a atividade é maior do que 5% do normal e moderada quando a atividade do fator de coagulação encontra-se entre esses dois valores. Cerca de 50% dos pacientes hemofílicos têm doença grave ou moderada e necessitam de tratamento para as hemorragias graves, desde várias vezes ao mês até poucas vezes por ano.

Normalmente, os pacientes que sofrem de hemofilia B são tratados com fator IX obtido a partir do plasma humano de pacientes sadios. Mas a administração de derivados do sangue em pacientes apresenta alto risco de contaminação por agentes infecciosos, como hepatite, AIDS, infecções por bactérias e parasitas. Por esse motivo, em vários países do mundo vem crescendo significativamente o emprego dos produtos obtidos por engenharia genética. No Canadá, por exemplo, uma lei exige, desde 1995, que apenas fatores de coagulação sangüínea deste tipo sejam comercializados, em detrimento dos hemoderivados.

Até a década de 90, as tecnologias para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico se restringiam à cultura de células de mamíferos *in vitro* ou produção em microorganismos. A partir daí, a utilização de animais transgênicos demonstrou ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em larga escala e custos mais reduzidos (Houdebine, 1994; Wall, 1996).

Várias são as aplicações da tecnologia da transgênese animal. Segundo Axelrod et al. (1990) foi demonstrado que células primárias de fibroblastos de pele de cães hemofílicos, transfectadas por retrovírus contendo cDNA do fator IX de coagulação, secretaram altos níveis do fator IX biologicamente ativo no meio de cultura em que as células estavam sendo cultivadas. Já Choo et al. (1987) produziram camundongos transgênicos pela microinjeção de cDNA de fator IX humano nos pronúcleos de ovócitos pré-fertilizados. Os camundongos transgênicos expressaram altas taxas do mRNA e atividade de coagulação ativa, que foram indistinguíveis da atividade do fator IX provenientes do plasma normal humano.

Esses dados demonstram a capacidade de expressão de proteínas recombinantes altamente complexas em camundongos transgênicos. Além de servir como *background* para a produção de fator IX humano em animais de grande porte (Schnieke et al., 1997; Cibelli et al., 1998) e em larga escala de produção, para aplicação terapêutica e de terapias gênicas para a hemofilia B.

Inserção de DNA exógeno

DNAs exógenos podem ser inseridos em genomas por meio de integração retroviral, transposons, e por técnicas não-virais de transferência de genes, como por exemplo, ensaios de transfecção. Os locais de tais inserções são usualmente identificados por preparação de bibliotecas genômicas e isolamento de linhagens clones contendo o DNA exógeno e as seqüências flaqueadoras. Neste projeto, linhagens celulares bovinas transgênicas foram utilizadas como modelo de estudos da integração dos transgenes. Várias linhagens celulares clones de MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) transfectadas foram expandidas a partir de uma única célula isolada e colocada em cultivo celular até a expansão em torno de $36 \mu\text{g}$ de DNA. As linhagens celulares preestabelecidas foram plaqueadas numa concentração de 3×10^5 células/ml em uma placa de 24 poços e transfectadas com o vetor plasmidial pCIneo- β , previamente construído no laboratório, compreendendo os genes *neo* (antibiótico neomicina) e *β -gal* (β -galactosidase) sob controle do promotor constitutivo CMV (citomegalovírus). A transfecção realizou-se utilizando o

reagente LipofectaminaTM (Invitrogen, USA), segundo Oliveira et al., 2005. Vinte dias após a transfecção e seleção em meio suplementado com antibiótico geneticina (G418: 400 µg/ml), as células transgênicas foram isoladas e expandidas em cultura. O DNA genômico das linhagens clones foram resgatados e as seqüências flanqueadoras foram identificadas pela técnica de resgate de plasmídeo em *Escherichia coli*.

Uma vez que a integração de DNAs exógenos pela técnica de transfecção dá-se aleatoriamente, o método baseado na técnica de IPCR (PCR invertido) para amplificar a região flanqueadora do DNA cromossomal no local de inserção do transgene é um método simples e útil para este propósito. A utilização desta técnica por meio de importantes estudos deve contribuir para novos conhecimentos na construção de vetores bovinos com genes-alvo.

Genes-alvo é um método mais poderoso e eficiente de manipulação genética e requer basicamente os mesmos procedimentos de transfecção, seleção e cultivo celular. O objeto de alcance para inúmeros benefícios biomédicos, como por exemplo, a ablação de antígenos de transplantes xenorreativos, inativação de genes responsáveis por doenças neuropatogênicas e a inserção precisa de transgenes determinados para produzir proteínas de terapia humana, têm incentivado setores tanto comerciais quanto medicinais para o investimento nesta nova tecnologia, cuja proposta baseia-se no local de integração apropriado de uma maneira mais exata e conseqüentemente mais eficiente a fim de produzir determinadas variantes em quantidades desejáveis.

Vetores de expressão

O ponto chave da tecnologia de transgênese se resume na introdução de determinada informação genética com nova funcionalidade no genoma hospedeiro. A estratégia para a construção de um "transgene" envolve a seleção de um elemento regulatório gênico (geralmente denominado promotor, mas usualmente contendo um elemento "enhancer" (acentuador) além de um promotor) que tem como função determinar o tecido no qual o gene será expresso, bem como o tempo e a magnitude de expressão. Em alguns casos, o

elemento regulatório pode agir como um “interruptor”, permitindo ao transgene ser “ligado” (ativado) ou “desligado” (inativado). A segunda parte da construção gênica consiste na sequência de DNA que codifica a proteína desejada (geralmente referida como o componente estrutural de um transgene). A
5 finalização do transgene se restringe ao elemento regulatório denominado “terminador” que tem a função de “avisar” o término da transcrição do transgene em questão. A maioria dos terminadores consistem numa sequência rica de A (nucleotídeo Adenina), denominada de cauda poly(A), responsável pela “sinalização” ao mecanismo de transcrição de que aquela sequência é o
10 término do transgene.

Cultivo de células animais

A cultura de tecidos surgiu no começo do século vinte (Harrison, 1907; Carrel, 1912) como um método para se estudar o comportamento das células animais desprovidas de variações sistêmicas ocorridas no organismo animal.
15 Essas células oscilam em número e em tamanho tanto durante a homeostase, quanto sob condições de *stress*. A técnica foi elaborada primeiramente pela desagregação de fragmentos de tecidos, sendo que o crescimento das células limitava-se à sua migração, a partir do fragmento do tecido dissociado. A cultura de um tecido pode ter como origem a dissociação do material biológico,
20 tratado de diferentes formas (enzimático, mecânico ou químico), sendo que as células dispersas desse tecido tratado podem então ser cultivadas *in vitro* para subseqüentes estudos.

A tecnologia de cultura de tecidos tem sido adotada aplicavelmente dentro de muitas rotinas na medicina e na indústria. Análises cromossomais de
25 células, retiradas do útero pela técnica de amniocentese, não só podem revelar distúrbios genéticos do feto que ainda nem nasceu e infecções virais podem ser analisadas qualitativamente e quantitativamente por meio de monocamadas de cultura de células hospedeiras, efeitos tóxicos de certos componentes farmacêuticos, além de análises de potenciais poluentes do meio ambiente que
30 podem ser detectados e mensurados por meio de ensaios de formação de colônias (Freshney, 1992).

Ao se começar uma cultura de tecidos, alguns parâmetros devem ser ajustados, como o controle físico-químico do meio ambiente das células: pH, temperatura, pressão osmótica, O₂, CO₂, etc., mantendo uma condição fisiológica relativamente constante e controlada. A maioria dos meios de cultura utilizados ainda requer suplementação com soro, cuja concentração é variável dependendo do tecido em questão (Honn *et al.*, 1975). E podem conter ainda elementos indefinidos, tais como certos hormônios e outras substâncias regulatórias. Gradualmente, as funções do soro são estudadas e como resultado estão substituindo-o cada vez mais por constituintes definidos (Olmsted, 1967).

O tipo celular eleito para ser cultivado deve estar baseado nos fins de utilização da cultura, ou seja, as células estarão destinadas para: transformação genética, linhagem celulares permanentes, doadoras de núcleo para transferência nuclear, monocamada para co-cultivo etc. Além disso, o laboratório deve dispor, no mínimo, de equipamentos necessários e condições de assepsia, antes de se iniciar uma cultura de tecidos.

No presente trabalho foram cultivadas linhagens celulares somáticas de bovinos *in vitro*. As células MDBK são consideradas imortalizadas, ou seja, as células são senescentes, mesmo quando cultivadas *in vitro*, podendo ser submetidas a mais de 300 repiques (Lisaukas *et al.*, 2007). Essas células são aderentes, de fácil manutenção e crescimento rápido, compatíveis com longos períodos de cultura e intervenções ao longo das análises de monitoramento requeridas.

Modificação genética de células de mamíferos

Várias tecnologias para a introdução e expressão das construções gênicas em diferentes animais vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas. Sistemas acurados de transporte de poucas quantidades de DNA se restringem (1) à microinjeção de DNA dentro do pronúcleo masculino de ovócitos fertilizados, sendo utilizada para produção de camundongos transgênicos (Lisaukas *et al.*, 2008), coelhos (Rosochacki *et al.*, 2002), ovinos (Simons *et al.*, 1988; Hammer *et al.*, 1985), suínos (Hammer *et al.*, 1985) e bovinos (Wall

et al., 1985; Wall *et al.*, 1988; Krimpenfort *et al.*, 1991; Wall *et al.*, 1996), mesmo com apenas uma pequena proporção (~5%) dos animais contendo o transgene integrado em seu genoma (Eyestone, 1994; Damak *et al.*, 1996); (2) à utilização de células espermáticas como fontes carreadoras de DNA exógeno (Gandolfi *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 1999; Lauria & Gandolfi, 1993; Lavitrano *et al.*, 1989; Brackett *et al.*, 1971); e (3) a vetores baseados em transposons (Belur *et al.*, 2003). Por outro lado, sistemas que transportam grandes quantidades de DNA envolvem o uso de vetores retrovirais (Chan *et al.*, 1998; Haskell & Bowen, 1995; Huszar *et al.*, 1985; Jahner *et al.*, 1985; van der Putten *et al.*, 1985), por sua eficiência de penetração celular e integração estável do transgene no genoma hospedeiro. Uma vez que retrovírus conseguem apenas infectar células em divisão celular, podendo causar efeitos deletérios nas células, como resultado de mutagêneses insercionais quando da integração do provírus no genoma (Onions *et al.*, 1993), sistemas mais eficientes de transporte de DNA, chamados de vetores adenovirais, que conseguem infectar células que não estão em divisão celular, podem também ser utilizados, apesar de não conseguirem se integrar no genoma hospedeiro (Channon *et al.*, 1996; Tsukui *et al.*, 1996; Feldman & Isner, 1995). Outros sistemas de vetores virais, chamados vetores epissomais, utilizam o genoma viral de um papilomavírus tipo1 de bovino e se mantêm como elemento genético extracromossomal estável de auto-replicação (DiMaio *et al.*, 1982; Ohe *et al.*, 1995; Sarver *et al.*, 1981; Mannik *et al.*, 2003).

Atualmente o método mais seguro e mais simples requerido para transfectar células de mamíferos é a lipotransfecção, utilizando lipossomos catiônicos (Cibelli, 1998; Keefer, 2001; Oliveira *et al.*, 2005). O mecanismo de transfecção mediado por lipossomo aparece como resultado da associação entre os lipídios catiônicos e o DNA que fornecem uma rede de cargas positivas ao redor do vetor, permitindo a ligação com a rede de cargas negativas da superfície celular (Felgner *et al.*, 1989). Lipossomos são translocados para dentro da célula por fusão com a membrana plasmática ou por fagocitose (Wrobel & Collins, 1995; Friend *et al.*, 1996), e algumas

partículas podem entrar no núcleo por fusão com o envelope nuclear (Wrobel & Collins, 1995; Friend *et al.*, 1996; Thierry *et al.*, 1997). Com isso, animais clones bovinos podem ser produzidos a partir de linhagens caracterizadas de células geneticamente modificadas, como fontes doadoras de núcleos transformados e microinjetadas em ovócitos previamente enucleados (Campbell *et al.*, 1996; Schnieke *et al.*, 1997; Iguma *et al.*, 2005).

Lócus de integração

Devido à aleatoriedade da integração do transgene no genoma bovino pela técnica de lipotransfecção, apenas um pequeno número de eventos irá gerar animais transgênicos, expressando a proteína de interesse em níveis desejados (Schnieke *et al.*, 1997). A fim de aprimorar o método de lipotransfecção, alguns autores têm estudado o lócus de integração do vetor plasmidial no genoma hospedeiro (Shi-Wu Li *et al.*, 1996, Lisauskas *et al.*, 2007), bem como a caracterização desses locais. A abordagem baseia-se na técnica de resgate do plasmídeo em *Escherichia coli* e permite a retirada do vetor de expressão do genoma em estudo, e a caracterização das regiões flangeadoras do DNA hospedeiro, a fim de isolar as regiões de integração dos transgenes (Mannik *et al.*, 2003).

A vantagem, em se estudar o lócus de integração do transgene possibilita a seleção e geração de eventos elites que expressem o transgene em níveis mais altos e desejáveis, além da utilização de linhagens aptas à transferência nuclear para a geração de bovinos transgênicos. O sucesso reportado por McCreath *et al.* (2000) baseia-se em estratégias desenvolvidas para a aplicação da técnica na geração de vetores bovinos com genes-alvo ("gene targeting").

Neste trabalho, parâmetros preestabelecidos de lipotransfecção para células somáticas bovinas (Oliveira *et al.*, 2005; Oleskovicz *et al.*, 2004) foram utilizados como protocolo base e aplicados em linhagens celulares bovinas MDBK (Lisauskas *et al.*, 2007), a fim de se estudar os locais de integração dos transgenes para servirem como modelo de transformação genética de células aptas a serem doadoras de núcleos transgênicos para a transferência nuclear.

Células-tronco

O nome células-tronco foi originado da tradução do inglês de “stem-cell”. “Stem” significa caule, haste. O verbo “to stem” por sua vez, significa originar. As células-tronco têm essa denominação por terem a capacidade de regenerar células do sangue e de diversos tipos de tecidos que compõem o corpo humano. Por exemplo: células da pele só podem constituir a pele mas, as células-tronco podem constituir diferentes tecidos do organismo.

5
10
15
Todo organismo pluricelular é composto por diferentes tipos de células. Entre as cerca de 75 trilhões de células existentes em um homem adulto, por exemplo, são encontrados em torno de 200 tipos celulares distintos. Todos eles derivam de células precursoras, denominadas células-tronco (“stem cells”). O processo de diferenciação, que gera as células especializadas — da pele, dos ossos e cartilagens, do sangue, dos músculos, do sistema nervoso e dos outros órgãos e tecidos humanos — é regulado, em cada caso, pela expressão de genes específicos nas células-tronco, mas ainda não se sabe em detalhes como isso ocorre e que outros fatores estão envolvidos.

20
25
As células-tronco são células indiferenciadas, que podem se multiplicar e regenerar tecidos lesionados porque têm a capacidade de se transformar em células idênticas às dos tecidos em que foram implantadas. Por exemplo: se uma pessoa com infarto do miocárdio tem uma parte do coração afetada e as células dessa região morrem, as células-tronco podem se transformar em células cardíacas e substituir as células mortas, regenerando o tecido lesionado. Outra hipótese, no caso do diabetes, é de que as células-tronco, se inseridas no pâncreas, poderiam se diferenciar e começar a produzir insulina, o que traria a cura para pessoas portadoras dessa doença.

30
As células-tronco estão presentes desde a vida embrionária até a vida adulta, e provavelmente até nossa morte. São elas as responsáveis pela formação do embrião e também pela manutenção dos tecidos na vida adulta. Elas estão presentes em: vários tecidos humanos (sangue, medula e outros tecidos), mas em quantidade muito pequena; no cordão umbilical e na placenta

(em quantidades bem maiores); em embriões nas fases iniciais da divisão celular, isto é, na fase de blastocisto.

Classificação morfológica

- 5 - Totipotentes: As células-tronco embrionárias que podem formar todos os tecidos incluindo a placenta são denominadas embrionárias - totipotentes. Elas constituem o primeiro grupo de até 32 células, e se formam nas primeiras 72 horas após a fecundação do óvulo. Neste momento, não é possível identificar neste grupo celular qualquer diferenciação de tecido específico. A formação da placenta e de seus anexos somente ocorre quando estas células totipotentes
10 são implantadas no útero.
- Multipotentes: As células embrionárias, a partir do quinto ou sexto dia após a fecundação, quando constituem um grupo de 64 células, são capazes de formar qualquer espécie de tecido exceto placenta, e são denominadas células multipotentes.
- 15 - Oligopotentes: As células-tronco adultas que podem originar mais de um tipo de tecido são chamadas oligopotentes, e encontram-se, por exemplo, no tecido intestinal.
- Unipotentes: Em órgãos já formados, por exemplo, o sistema nervoso, são encontradas células-tronco tipo adulto que dão origem a um único tipo de
20 tecido, a função provável destas células é a reparação de tecidos determinados. Já na medula óssea a função das células-tronco tipo adulto é manter o nível de elementos figurados do sangue que necessitam constante substituição.

Clonagem Terapêutica (Yanagimachi R, 2002)

- 25 Esse processo consiste em obter um embrião da pessoa doente por meio da técnica de clonagem e retirar as suas células-tronco. Essas células têm potencial para se transformar em qualquer tipo de célula adulta do corpo, como, por exemplo, células cardíacas ou nervosas. Assim, elas poderiam ser estimuladas a se transformar no mesmo tipo de célula que estão lesadas no
30 organismo do doente. Por exemplo: uma pessoa com leucemia que necessitasse de um transplante de medula seria clonada, dando origem a um

embrião, do qual seriam retiradas as células-tronco. Dessa forma, a pessoa seria doadora para si mesma, sem correr o risco de que seu organismo viesse a rejeitar o transplante, pois as células utilizadas seriam retiradas de seu clone, que apresentaria a mesma constituição genética que ela.

5 A utilização das células-tronco para fins terapêuticos pode representar talvez a única esperança para o tratamento de inúmeras doenças ou para pacientes que sofreram lesões incapacitantes da medula espinhal que impedem seus movimentos. Em 1997 foi anunciado o primeiro mamífero gerado a partir de células somáticas de um indivíduo adulto por meio da
10 transferência nuclear, a ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997). Dolly só nasceu depois de 276 tentativas que fracassaram. Além disso, dentre as 277 células "da mãe de Dolly" que foram inseridas em um óvulo sem núcleo, 90% não alcançaram nem o estágio de blastocisto. A tentativa posterior de clonar outros mamíferos tais como camundongos, porcos, bezerros, um cavalo e um veado,
15 também tem mostrado uma eficiência muito baixa e uma proporção muito grande de abortos e embriões malformados. É interessante que dentre todos os mamíferos que já foram clonados, a eficiência é um pouco maior em bezerros (cerca de 10% a 15%). Penta, a primeira bezerra brasileira clonada a partir de uma célula somática adulta, em 2002, morreu com pouco mais de um
20 mês. Ainda em 2002, foi anunciada a clonagem do copy cat, o primeiro gato de estimação clonado a partir de uma célula somática adulta. Para isto foram utilizados 188 óvulos que geraram 87 embriões e apenas um animal vivo. Na realidade, experiências recentes com diferentes modelos animais têm mostrado que essa reprogramação dos genes, para o estágio embrionário, o processo
25 que originou Dolly, é extremamente difícil.

O grupo liderado por Ian Wilmut, o cientista escocês que se tornou famoso por essa experiência, afirma que praticamente todos os animais que foram clonados nos últimos anos a partir de células não embrionárias estão com problemas. Entre os diferentes defeitos observados nos pouquíssimos animais
30 que nasceram vivos após inúmeras tentativas, observa-se: telômeros encurtados; placentas anormais; gigantismo em ovelhas e gado; defeitos

cardíacos em porcos; problemas pulmonares em vacas, ovelhas e porcos; problemas imunológicos; falha na produção de leucócitos; defeitos musculares em carneiros.

De acordo com Hochedlinger e Jaenisch (2003), os avanços recentes em clonagem reprodutiva permitem quatro conclusões importantes: 1) A maioria dos clones morre no início da gestação; 2) os animais clonados têm defeitos e anormalidades semelhantes, independentemente da célula doadora ou da espécie; 3) essas anormalidades provavelmente ocorrem por falhas na reprogramação do genoma; 4) a eficiência da clonagem depende do estágio de diferenciação da célula doadora. De fato, a clonagem reprodutiva a partir de células embrionárias tem mostrado uma eficiência de 10 a 20 vezes maior provavelmente porque os genes, que são fundamentais no início da embriogênese, estão ainda ativos no genoma da célula doadora.

Um dos objetivos da biotecnologia animal é a aplicação de técnicas atuais da engenharia genética para a produção de animais de grande porte com características desejáveis. Os carneiros (Dattena et al., 2006), o porco (Piedrahita et al., 1990), o coelho (Chiang et al., 2008), os bovídeos (Keefer et al., 1994; Verma et al., 2007), o rato (Ouhibi et al., 1995), e o macaco (Mitalipov et al., 2003) tem sido relatados como potenciais fontes doadoras de células-tronco embrionárias.

O método usado para o isolamento de células-tronco embrionárias humanas foi adaptado às outras espécies com algumas modificações. Entretanto, tentativas preliminares de cultura da massa interna celular (ICM) de várias espécies sobre camada de células embrionárias de camundongos ou sobre cultura primária de fibroblastos de camundongos na presença do fator inibitório da leucemia (*LIF*) foram raramente bem sucedidas. Uma combinação de fatores de crescimento pode ser requerida para a proliferação destas células pluripotentes, como foi demonstrado no cultivo de células de linhagens primordiais de camundongos (Tielens et al., 2006). No nosso estudo, células-tronco embrionárias bovinas, isoladas da massa celular interna de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, só foi possível quando cultivada sobre camada de

células-tronco embrionárias de camundongos, fornecendo, dessa maneira, meio de cultivo condicionado por tais células em crescimento concomitante.

No Brasil, com a perspectiva de baixas taxas de reconstrução embrionária e baixas taxas gestacionais após a clonagem por transferência nuclear por meio da utilização de células somáticas, geraram a necessidade de se isolar células-tronco a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro*, como expectativa no uso dos núcleos transfectados para a geração futura de bovinos transgênicos utilizados como biorreatores.

A técnica de isolamento de células-tronco embrionárias bovinas abre uma perspectiva futura viável para a geração de linhagens clones de células-tronco para estudos de função gênica, de expressão gênica e na geração de núcleos transformados com genes exógenos, principalmente de interesse farmacológico, como fontes doadoras desses núcleos para a transferência nuclear e à geração de animais biorreatores.

É extremamente importante que as pessoas entendam a diferença entre clonagem humana, clonagem terapêutica e terapia celular com células-tronco embrionárias ou não. A maioria dos países da comunidade européia, o Canadá, a Austrália, o Japão, a China, a Coreia e Israel aprovaram pesquisas com células embrionárias de embriões até 14 dias. Essa é também a posição das academias de ciência de 63 países, inclusive o Brasil. É fundamental que a nossa legislação também aprove estas pesquisas porque elas poderão salvar inúmeras vidas.

Essas 63 academias de ciência do mundo que se posicionaram contra a clonagem reprodutiva defendem as pesquisas com células embrionárias para fins terapêuticos. Em relação aos que acham que a clonagem terapêutica pode abrir caminho para clonagem reprodutiva devemos lembrar que existe uma diferença intransponível entre os dois procedimentos: a implantação ou não em um útero humano. Basta proibir a implantação no útero. Se pensarmos que qualquer célula humana pode ser teoricamente clonada e gerar um novo ser, poderemos chegar ao exagero de achar que toda vez que tiramos a cutícula ou arrancamos um fio de cabelo, estamos destruindo uma vida humana em

potencial. Afinal, o núcleo de uma célula da cutícula poderia ser colocado em um óvulo enucleado, inserido em um útero e gerar uma nova vida!

A prática da clonagem-terapêutica suscita grandes dúvidas que exigem, por parte dos órgãos responsáveis estudo, bom senso e ética, para que não se legalize um comportamento que contrarie os interesses humanos e, por outro lado, abra um campo enorme à exploração indiscriminada.

Existem células-tronco em vários tecidos (como medula óssea, sangue, fígado) de crianças e adultos. Entretanto, a quantidade é pequena e não sabemos ainda em quais tecidos são capazes de se diferenciar.

As células-tronco embrionárias são importantes fontes na medida em que fornecem resultados promissores no desenvolvimento embrionário *in vitro* de clones de animais domésticos após a técnica de transferência nuclear. Isso se dá pela potencial aplicação das células-tronco na possibilidade intrínseca de diferenciação celular em qualquer tecido adulto, e neste caso, em se comportarem como célula embrionária.

No Brasil, as pesquisas, ainda em andamento, indicam que as células embrionárias seriam capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos. Mas, a Lei de Biosegurança - que gera muitas polêmicas - só permite que sejam usadas para fins científicos e, no caso das humanas, após estarem armazenadas por mais de 3 anos, com o consentimento dos pais.

Os avanços na biotecnologia fizeram com que o DNA pudesse ser manipulado de maneira controlada, gerando espécies modificadas de ratos, camundongos, ovelhas, bovinos, cabras, suínos e até primatas. A geração de modelos transgênicos, como por exemplo, o camundongo, tornou possível a utilização de animais em experimentação produzidos em laboratório como fontes para estudo de características funcionais do homem que se desejam estudar.

A vantagem da aplicação de ferramentas de engenharia genética para o desenvolvimento de técnicas de produção de biofármacos e vacinas é a possibilidade de aumento do rendimento e da capacidade de produção, propiciando uma redução dos custos, assim como a possibilidade de melhor

controle dos processos e qualidade dos produtos. O Brasil, hoje, depende da importação de biofármacos. As pesquisas no país pretendem contribuir para mudar esta realidade, por meio do desenvolvimento de tecnologias de ponta para a obtenção de produtos recombinantes.

- 5 A utilização de animais transgênicos tem demonstrado ser altamente eficiente para a produção de proteínas recombinantes no leite, em larga escala e custos mais reduzidos, os quais têm recebido aceitação pelas agências de regulamentação responsáveis pela produção de fármacos. Apesar de inúmeras questões éticas envolvendo o tema esperarem soluções apropriadas, os
- 10 animais transgênicos são muito promissores para a bioindústria, para diagnósticos clínicos e para estudos em pesquisa básica.

Sendo assim, a expressão do fator IX de coagulação biologicamente ativo em sistemas de expressão utilizando animais transgênicos, possibilitou a avaliação do funcionamento da expressão do recombinante em camundongos

15 transgênicos (Lisaukas et al., 2008), justificando a aplicabilidade futura dos sistemas em bovinos transgênicos utilizados como biofábricas ou biorreatores.

O gene do *fator IX de coagulação humana* foi integrado por meio da transgenia por adição, o método mais utilizado na introdução de genes, e neste caso, do gene exógeno. Genes exógenos pertencem à outra espécie, neste

20 caso espécie humana e são usados para fazer um animal produzir uma nova proteína, ausente na espécie receptora, neste caso camundongos.

Uma vez que a inserção do transgene no genoma hospedeiro, por esse método, até onde se sabe é aleatória, ela pode ser ineficaz ou até mesmo letal, devido ao local onde o gene está integrado ser incerto. Na primeira

25 possibilidade, o transgene pode se inserir em uma região do cromossomo que dificulta ou inviabiliza a sua expressão, fazendo com que o animal não apresente o fenótipo em nível desejado. Na segunda, a inserção aleatória pode provocar, por exemplo, a inativação de um gene essencial ao desenvolvimento na fase embrionária, com conseqüente inviabilidade ou morte prematura do

30 animal. Nesse caso, o fenótipo do animal transgênico é independente do transgene, ou seja, não foi causado por uma característica do gene inserido,

mas pelo local onde esse gene se integrou. Uma questão importante em experimentos com animais transgênicos diz respeito ao “efeito de posição” dos genes e os efeitos da região na qual eles se inserem. Ou seja, devemos discutir os diferentes padrões da expressão do transgene no genoma hospedeiro, dependente de seu sítio de integração. Por causa dessas possibilidades, a comparação de várias linhagens transgênicas com a mesma modificação genética é imprescindível para que se possa inferir a inserção não-deletéria de um gene ou tentar correlacioná-lo ao nível da expressão do transgene no local da inserção (Lisauskas et al., 2007). No intuito de aplicar esse modelo de estudo na geração de eventos elites de expressão dos transgenes, a chamada modificação genética dirigida ou controlada (genes-alvo) é o método empregado para a modificação e inativação de genes que exige o conhecimento de sua localização no genoma. Essa técnica possibilita substituir um gene funcional por uma seqüência mutada que, uma vez introduzida, inativa o gene endógeno original, gerando um animal conhecido como modelo knock-out. Da mesma forma, é possível alterar uma pequena seqüência do gene, gerando um modelo knock-in que produzirá uma proteína modificada em vez da proteína endógena presente no animal. O termo knock-in se deve ao fato de o gene endógeno ser retirado do genoma e substituído por outro com uma pequena modificação.

Várias técnicas são utilizadas para produzir animais transgênicos por adição de segmentos de DNA ao genoma - entre elas, a microinjeção pronuclear de embriões, a transferência de DNA mediada por espermatozóides, a infecção de embriões por vetores retrovirais, a transferência de DNA mediada por transposons, a injeção de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas, a transferência nuclear de células geneticamente modificadas. Dentre todos esses procedimentos, a microinjeção pronuclear é o mais utilizado na produção de camundongos transgênicos. A taxa de integração do DNA no genoma embrionário é baixa - cerca de 1% a 6% (Lisauskas et al., 2008). Ou seja, apenas alguns animais nascidos carregarão o transgene integrado em seus cromossomos. A integração do transgene por

microinjeção, como dito anteriormente, ocorre de forma aleatória no genoma, e todas as células do animal são geneticamente modificadas, inclusive as germinativas, de modo que essa alteração será transmitida aos seus descendentes. Todo animal transgênico positivo originado de um embrião microinjetado é classificado como fundador de uma linhagem transgênica única, que difere de outro fundador quanto ao local de inserção e ao número de cópias do transgene no genoma. Outro método a ser aplicado na geração de camundongos geneticamente modificados consiste no isolamento e manutenção de células-tronco indiferenciadas *in vitro* e, posteriormente, com a modificação genética destas e injeção em embriões receptores, pode-se produzir camundongos quiméricos. Isso provou definitivamente que essas células são capazes de iniciar o processo de diferenciação e produzir um indivíduo completo. As células-tronco embrionárias são totipotentes, ou seja, capazes de gerar qualquer tipo de tecido. Elas são oriundas de embriões na fase inicial de desenvolvimento, após cerca de quatro dias da fertilização do óvulo. O embrião nessa fase é denominado blastocisto e possui centenas de células-tronco na sua massa celular interna, que darão origem a todos os tecidos do organismo adulto. Atualmente, essa técnica é rotineiramente aplicada em camundongos, uma das únicas espécies - além da humana - em que se domina totalmente o cultivo de células-tronco embrionárias. Para outras espécies, há dificuldade em se manter indiferenciadas as células-tronco derivadas de embriões em cultura. No nosso trabalho, células-tronco embrionárias bovinas foram isoladas e cultivadas por longos períodos mantendo sua indiferenciação. O próximo passo ao isolamento de células-tronco embrionárias é a seleção daquelas geneticamente modificadas, e a técnica de eleição que se mostrou eficaz foi por meio da técnica a laser. As células transfectadas podem formar linhagens clones e bancos de células para a futura produção de bovinos transgênicos.

Inúmeras são as aplicações potenciais da utilização de animais geneticamente modificados como modelos para o estudo das causas, da progressão, dos estágios e sintomas de doenças cardiovasculares, auto-imunes, neurológicas, entre outras. Ao se utilizar linhagens de células-tronco

geneticamente modificadas pode-se permitir uma análise detalhada da fisiopatologia de doenças, propiciar também o desenvolvimento de novas formas de tratamento, novos testes diagnósticos, agentes terapêuticos mais eficazes e baratos, e o tão esperado estabelecimento de protocolos de terapia gênica.

Além disso, o transplante de órgãos e tecidos de animais em seres humanos, ou xenotransplante, é também foco de interesse no uso dos transgênicos. Existe carência mundial de órgãos para transplantes clínicos, e infelizmente muitos pacientes morrem na fila de espera. As vantagens do xenotransplante sobre os transplantes tradicionais incluem o suprimento ilimitado de órgãos e a conseqüente diminuição das filas de espera. Atualmente os pesquisadores desenvolvem porcos transgênicos cujos órgãos podem ser seguramente utilizados para transplante em humanos. Para isso, é preciso superar o sistema imunológico que reconhece e destrói todas as células que não possuem marcadores específicos humanos na sua superfície, ocasionando o fenômeno da rejeição. Para contornar esse problema, foram criados porcos transgênicos portadores de um gene que codifica uma proteína da superfície de células humanas. Como resultado, esses porcos possuem órgãos contendo marcadores de células humanas, o que impede que componentes do sistema imune do receptor ataquem e destruam o órgão transplantado. Paralelamente, outros grupos de pesquisa estudam uma estratégia diferente para minimizar a rejeição de órgãos na xenotransplantação. Ela consiste em eliminar do genoma do porco, pelo método de knockout, o gene que codifica a α -1,3-galactosiltransferase, uma enzima presente na superfície das células daquele animal que é reconhecida pelo sistema imunológico humano. Sem esta enzima, a primeira etapa na rejeição ao órgão transplantado não acontece. Apesar das boas perspectivas do xenotransplante, a utilização do método ainda é foco de inúmeros aspectos éticos que devem ser bastante discutidos.

Outra aplicação promissora dos transgênicos é na pecuária e indústria. Os métodos de seleção de características desejadas, como por exemplo, aumentar a produção de leite, estão baseados no cruzamento seletivo e

convencional dos animais. Porém, o cruzamento seletivo é extremamente lento e dispendioso, além de ser um processo que não garante os resultados desejados. As novas técnicas de biologia molecular tornaram possível a introdução ou manipulação de características desejáveis nos animais, em menos tempo e com mais precisão. Como exemplo, citamos a geração de vacas transgênicas, manipulando-se genes endógenos, as quais produzem maior quantidade de leite/dia.

Na indústria farmacêutica um processo denominado "humanização de camundongos" utiliza-se desses modelos animais no desenvolvimento de novas drogas. Por meio desse processo, um gene é retirado do genoma do animal pela técnica de knock-out e, em substituição, um gene humano é inserido pelo método de adição gênica. Essa técnica deve facilitar enormemente o desenvolvimento de novos medicamentos, barateando os custos e diminuindo o tempo para uma nova droga chegar às farmácias. Outra importante aplicação da transgenia animal é a produção de animais conhecidos como biorreatores. Estes são geralmente animais domésticos de médio e grande porte, utilizados para a produção de proteínas recombinantes humanas de grande interesse biológico e comercial, como enzimas, hormônios, fatores de crescimento, fatores da coagulação. Em geral a proteína de interesse é expressa no leite do animal, tornando sua produção mais barata e eficiente. Em 1997, o primeiro bovino transgênico, a vaca Rosie, produzia leite enriquecido com a proteína humana lactoalbumina. Esse leite transgênico é mais nutritivo para humanos que o leite natural, e poderia ser introduzido na alimentação de crianças com carência de nutrientes específicos. Há também pesquisas em curso voltadas para a produção de leite transgênico contendo as proteínas necessárias para o tratamento de doenças como fenilcetonúria, enfisema hereditário e fibrose cística. No nosso estudo, camundongas transgênicas produziram no leite o fator IX humano de coagulação. A proteína recombinante gerada foi testada e provou ser biologicamente eficaz na coagulação do sangue de pacientes hemofílicos.

O futuro da transgênese animal é indiscutivelmente o uso desses animais como biofábricas para a produção de proteínas recombinantes em benefício de nossa sociedade. Essa produção proporcionará ilimitada quantidade de medicamentos sendo produzidos de maneira abundante, além de fornecê-los a

5 um baixo custo e podendo suprir bancos de hospitais, principalmente os da rede pública de saúde. Atualmente o Brasil dispense grandes quantidades de dinheiro pagas à importação de fármacos não produzidos pelas indústrias brasileiras. Com essa tecnologia, o país economizará fundos de investimentos em outras áreas precárias do país, como educação e segurança pública.

10 Entretanto, apesar de as vantagens da utilização dos animais transgênicos, o Brasil ainda sofre com os muitos obstáculos políticos e legais que rondam a frenagem de tal tecnologia. Em um país que atualmente sofre com a falta de dinheiro para a importação de produtos essenciais para a manutenção da qualidade de vida de pessoas portadoras de doenças raras, a precariedade da

15 distribuição de medicamentos na rede pública de saúde, as constantes mortes de pessoas à espera de órgãos a serem transplantados, o alto custo na purificação de hemoderivados e o risco destes na transmissão de possíveis doenças, além da falta de estudos dos efeitos na aplicação de novas drogas manipuladas e distribuídas comercialmente, constitui um crime a tentativa de

20 barrar a ascensão da nova tecnologia e permitir que os brasileiros, no futuro, aumentem as suas chances de cura ou de simples expectativa de vida proporcionada pelas novas abrangências de tal tecnologia. Baseado nesses aspectos, a tecnologia do DNA recombinante, bem como a engenharia genética que já estão disponíveis em nosso país vem ao encontro da

25 concretização das possibilidades apontadas acima, se pessoas influentes em nosso país tentassem se interar dos benefícios, das possibilidades de longo alcance da tecnologia e dos reais riscos das técnicas em aplicação. Ao invés de trabalhar em leis e formas legais que vão de encontro aos reais benefícios para a população trazidos por esta tecnologia.

30 Essa positiva revolução da medicina, que envolverá a produção de recombinantes eficazes a baixo custo de produção, a produção ilimitada de

órgãos para xenotransplantes, a manipulação de células-tronco humanas para a cura de doenças cuja única solução é o uso dessas células totipotentes, deve ser absorvida como única solução viável para o Brasil cuja precariedade é o adjetivo principal em todas as áreas de excelência do país.

5 Em especial, a presente invenção está relacionada ao processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas e processo de purificação de proteínas geradas por tais células modificadas.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção,
10 de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Objeto da Invenção

15 A presente invenção está relacionada ao processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas e processo de purificação de proteínas geradas por tais células modificadas.

Em especial, a presente invenção se situa no campo da terapêutica médica e veterinária.

20 É, portanto, outro objeto da presente invenção o processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas compreendendo as etapas de:

a) construir vetores de expressão compreendendo:

25 a1) pelo menos uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene do fator IX de coagulação sanguínea humano e/ou seus fragmentos contendo peptídeo sinal bovino na extremidade 5';

a2) pelo menos um promotor adequado.

b) contactar células-tronco embrionárias bovinas com os vetores de expressão de a).

30 Em especial, linhagens de células-tronco embrionárias bovinas foram isoladas a partir da massa celular interna de embriões bovinos produzidos in

vitro a fim de se tornarem, no futuro, fontes de células-tronco embrionárias bovinas, serem modificadas geneticamente e utilizadas para a transferência nuclear na obtenção de bovinos transgênicos.

É, portanto, outro objeto da presente invenção o processo de purificação de proteínas geradas por células-tronco embrionárias bovinas modificadas compreendendo as etapas de:

a) acoplar cauda de histidina à extremidade 3' de pelo menos uma sequência nucleotídica capaz de expressar o gene do fator IX de coagulação sanguínea humano e/ou seus fragmentos contendo peptídeo sinal bovino na extremidade 5';

b) purificar a), promovendo a separação do composto bioquímico.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Descrição das Figuras

A Figura 1 descreve o Vetor de expressão pBC1FIX (1A) usado para a geração dos camundongos transgênicos. A sequência codante do gene *FIX* humano foi fusionada ao sinal de secreção de beta-caseína bovina (MAKVLILACLVALALA) e clonado no sítio de restrição de *Xho*I do vetor de expressão comercial pBC1 (Invitrogen, EUA).

A Figura 1B representa a β -caseína 3' DNA genômico que permite a correta tradução e poliadenilação do mRNA.

A Figura 1C representa a Ampicilina.

A Figura 1D representa a pMB1 ori.

A Figura 1E representa 2X isolado de β -globina.

A Figura 1F (P β -caseína) representa a indução da expressão do transgene em células epiteliais da glândula mamária.

A Figura 1G representa fragmentos de DNA Genômico provenientes da região codificadora da proteína β -caseína.

A Figura 2 (A) descreve a Avaliação por meio de PCR nos camundongos transgênicos. 1, 2, 3, 4 correspondem aos camundongos transgênicos; 5 camundongos não-transgênicos; 6 controle negativo interno das reações; 7 sequencia do gene do *FIX* correspondente a 495 pb. A Figura 2 (B) descreve as Análises de *southern blot* das linhagens transgênicas 1 e 2 (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e da linhagem não-transgênica (7).

A Figura 3 descreve *Western blot* do leite de fêmeas transgênicas expressando o gene fo *FIX* humano. 1 corresponde a 350 ng da proteína do *FIX* purificada (Sigma, EUA); 2 corresponde a 100 µg de proteína total de leite de fêmea não-transgênica; 3 e 4 a 100 µg de fêmeas fundadoras transgênicas das linhagens 1 e 2; 5 e 6 a 100 µg da progênie F₁ da linhagem 1; 7 e 8 a 100 µg da progênie F₁ da linhagem 2.

A Figura 4 descreve o Isolamento manual do botão embrionário de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

A Figura 5 descreve Embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes fases do desenvolvimento, utilizados para o isolamento via laser de seu botão embrionário.

A Figura 6 descreve Cinco (5) Colônias de Células-tronco Embrionárias Bovinas isoladas pelo Sistema de Isolamento manual.

A Figura 7 descreve fotos em diferentes zoom da cultura de fibroblastos de camundongos utilizados como monocamada base para o cultivo de linhagens embrionárias de células-tronco de outras espécies.

A Figura 8 descreve Colônias ES cells de camundongos recém-repicadas – 5x.

A Figura 9 descreve Colônias ES cells recém-repicadas, indiferenciadas e em início de diferenciação

A Figura 10 descreve Colônias human ES cells transformadas com GFP em diferentes zoom sob contraste de fase.

A Figura 11 descreve Colônias human ES cells transformadas com GFP em diferentes zoom sob incidência de Ultra-Violeta.

As Figuras 12 e 13 descrevem RT-PCR e Western Blot de BMP-2 e BMP-4, respectivamente.

A Figura 14 descreve Fibroblastos bovinos transfectados com pCMV β , usando Lipofectamina (200X).

5 A Figura 15 descreve a detecção por PCR do gene neo em DNA genômico de fibroblastos bovinos a partir de 2 colônias celulares transfectadas, I-Marcador de peso molecular; II-PCR sem molde, para confirmar a ausência de contaminação na reação; III- 10pg do vetor pCI-neo purificado; IV-200 ng de fibroblastos de DNA não-transfectados; V- 200 ng de DNA de fibroblasto bovino
10 transfectado e VI – 200 ng de células de DNA transfectadas da segunda linhagem.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção,
15 mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.

Processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas

O processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas da presente invenção compreende as etapas de:

- 20 a) construir vetores de expressão compreendendo:
- a1) pelo menos uma sequência nucleotídica capaz de expressar o gene do fator IX de coagulação sanguínea humano e/ou seus fragmentos contendo peptídeo sinal bovino na extremidade 5';
 - a2) pelo menos um promotor adequado.
- 25 b) contactar células-tronco embrionárias bovinas com os vetores de expressão de a).

Vetores de expressão

Entende-se por “vetores de expressão” os vetores capazes de expressar
30 a informação genética de um fragmento de DNA inserido em um DNA exógeno e podem ser selecionados do grupo que compreende plasmídeos, vírus,

cosmídeos e/ou YACs. Os vetores de expressão são acoplados a promotores, que são sequências capazes de promover a expressão da sequência de DNA na célula desejada.

5

Expressão do fator IX recombinante humano no leite de camundongos

Construção do vetor de expressão

A região codificadora do gene do *fator IX humano* [(Número de acesso ao GeneBank XM_010270.4) (Yoshitake *et al.*, 1985) (Texto 1)] foi amplificada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir de uma biblioteca de cDNA (k TriplEx, Clontech, USA) de fígado humano. Esses fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega, USA) específico para clonagem de produtos de PCR. Os pares de primers: BCproFIX [5'-GCTCGAGATGGCAAAGGTCCTCATCCTTGCCTGCCTGGTGGCTCTGGCC
 15 CTTGCAACAGTTTTTCTTGATCATGAAA-3'], incluindo o sítio para a enzima *XhoI* (sublinhado) e a sequência do sinal de secreção da beta-caseína bovina (em negrito); e FIXstop3C [5'-CCTTCTCGAGCCATCTTTCATTAAGTGAGC-3'], incluindo o sítio para a enzima *XhoI* (sublinhado), resultaram na amplificação do fragmento de 1.378 pares de bases, o cassete de expressão a ser clonado. As reações de PCR foram conduzidas no termociclador em tubos de reação de 50 µL, contendo 10 ng DNA, 60 mM Tris/H₂SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 250 nM de cada dNTP, 200 nM de cada primer, e 5 U da enzima Taq platinum DNA polymerase high fidelity (Invitrogen, USA). Os ciclos de reações foram preliminarmente tratados a 95°C por 5 minutos e submetidos a 35 ciclos de amplificação consistindo de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 68°C por 1 min, com um ciclo final de alongamento de 68°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram seqüenciados utilizando-se os primers universais M13 e T7 em seqüenciador automático ABI Prism1 3700. O
 30 fragmento de 1.378 pares de bases, proveniente do gene do fator IX rearranjado, foi clonado no sítio de clonagem de *XhoI* do vetor de expressão

comercial pBC1 (Invitrogen, USA) para a geração do vetor final denominado pBC1FIX (Figura 1), que fora utilizado nas modificações genéticas dos mamíferos.

Produção *in vitro* de embriões bovinos

5 Os ovários provenientes da raça Holandesa foram coletados em um frigorífico, imediatamente após a morte dos animais e transportados em DPBS (Invitrogen, USA) em caixas térmicas em torno de 37 °C para o laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos. Agulhas descartáveis calibre 40x12cm foram utilizadas para a aspiração dos folículos sob vácuo de aproximadamente
10 10 mmhg (milímetros de mercúrio).

Os ovócitos foram coletados em tubos Falcon de 50 mL (Falcon, USA), e quando repletos, eram imediatamente transferidos para placas de Petri grandes (Falcon, USA) para serem rastreados e avaliados. Na medida em que os ovócitos eram selecionados, eram colocados em placas de Petri pequenas
15 (Falcon, USA) contendo o meio de seleção de ovócitos: 200 mL de TL Hepes Solution (CAMBREX), 3 mg/mL de BSA V (SIGMA), 2 mL de PTR [5 mL TL Hepes Solution (CAMBREX), 11 mg de Piruvic Acid (SIGMA)], e 100 µL de Gentamicin Sulfate [CAMBREX; [] 0,5 µL/mL].

Os ovócitos classificados em graus 1, 2 e 3 (Peixer et al., 1997), eram
20 colocados em meio de maturação contendo 4,5 mL de Medium 199 (CAMBREX, USA), 50 µL de PTR, 500 µL de Soro Fetal Bovino (Invitrogen, USA), 5 µL de Gonadotrophin (Sigma, USA), 5 µL de Gentamicin Sulfate (CAMBREX, USA) e 5 µL Estradiol (SIGMA, USA), em incubadora de cultivo celular à 39°C e 5% CO₂, em atmosfera com 100% de umidade.

25 Após a maturação dos ovócitos por 24 horas, estes eram pré-lavados e transferidos para placas com meio apropriado para a fertilização contendo 5 mL de IVF-TL Solution (EmbryoMax, USA), 30 mg de BSA-FAF (SIGMA, USA), 50 µL de PTR e 2,5 µL de Gentamicin Sulfate (CAMBREX, USA).

A inseminação era realizada com sêmen de touro Holandês comercial
30 (0,25 mL/palhetas congelada). As palhetas eram descongeladas por 10 segundos em ar e 20 segundos em banho-maria a 37°C. O sêmen era

centrifugado (1000 rpm/6 minutos) em meio de gradiente Percoll contendo [500 μ L de Percoll 90% (Invitrogen, USA) e 500 μ L de Percoll 45% (250 μ L de Percoll 90% com 250 μ L de PTR)]. O sobrenadante era descartado e o pellet contendo os espermatozoides viáveis era ressuspendido com 1 mL de meio TL Hepes (CAMBREX, USA). O sêmen era novamente centrifugado por 6 minutos e era descartado do sobrenadante em torno de 600 μ L, sendo que os 400 μ L restantes, ressuspensava o pellet formado.

Imediatamente antes à inseminação, era adicionada às gotas da fertilização 4 μ L da mistura das alíquotas de Heparina (10 μ g/mL; Sigma, USA) e de PHE (Penicilamina, Heparina e Epinefrina; SIGMA, USA). A dose inseminante em torno de 0,75 μ L/25 ovócitos era adicionada em cada gota e eram incubadas à 39°C e 5% CO₂, em atmosfera com 100% de unidade.

Os ovócitos fertilizados por 24 horas eram pré-lavados e transferidos para placas com meio de cultivo contendo 5 mL de SOF Solution (EmbryoMax, USA), 2,5 mL de Gentamicin Sulfate (CAMBREX, USA), 100 μ L de PTR, 50 μ L de Non-Essential AA Solution (100X) (SIGMA, USA), 100 μ L de Essential AA Solution (BME-50X) (SIGMA, USA) e 40 mg de BSA-FAF (SIGMA, USA). Estes embriões eram cultivados durante sete dias em incubadora à 39°C e 5% CO₂, em atmosfera com 100% de unidade, antes de serem utilizados no isolamento de sua massa celular interna.

Isolamento das células-tronco embrionárias bovinas e manutenção das linhagens

Um total de 260 embriões após sete dias de produção *in vitro* foi utilizado para o isolamento de células-tronco embrionárias bovinas. O botão embrionário ou a massa celular interna foi isolado por dissociação mecânica e colocados em placas de cultura sobre o tapete celular formado de células PMF-P3 tratadas com mitomicina C (Chemicon, USA), e cultivadas em incubadora à 39°C e 5% CO₂, em atmosfera com 100% de unidade.

O meio de cultivo das colônias de células-tronco embrionárias bovinas denominado ES cells media (Embryonic Stem cells media) consistia de 300 mL de meio Knock out D-MEM (Invitrogen, USA), 54 mL de Soro Fetal Bovino

(Hyclone, USA), 2,4 mL de Non-Essential AA Solution (100X) (SIGMA, USA), 2,4 mL de L-Glutamine 200mM (Invitrogen, USA), 0,4 mL Gentamycin (CAMBREX, USA), 250 µL de β-Mercaptoetanol (Sigma, USA) e 30 µL de leukemia-inhibitory factor (LIF; Sigma, USA).

- 5 A renovação do meio de cultivo se realizava a cada três dias, sendo que o repique era feito apenas a cada quinzena de cultivo das colônias de células-tronco embrionárias bovinas.

Descrição do método de isolamento manual das células-tronco embrionárias bovinas

- 10 Foram utilizados embriões D-7 para a remoção manual de células-tronco. Utilizou-se um sistema manual de micromanipulação em que as células do botão embrionário foram removidas precisamente por meio de navalhas ultra-finas (Bio-technology, USA) a fim de causar menor dano possível às células isoladas. Foram obtidas 05 colônias-tronco por este sistema de isolamento que
15 foram submetidas a análises moleculares para a certificação da pluripotência celular;

- A técnica consistiu em escolher embriões Grau I de classificação segundo Peixer et al. (1997), separá-los em gotas individuais para que a remoção do botão embrionário fosse de maneira isolada, evitando a contaminação celular
20 entre embriões.

Imediatamente após a secção, o botão embrionário foi transferido para placas de 04 poços (Nunc, USA), contendo meio ES cells, à 39°C e 5% CO₂, em atmosfera com 100% de umidade.

Modificação genética de células de mamíferos

- 25 O vetor PBC1-FIX foi utilizado na transformação estável das linhagens clones de células somáticas e de células-tronco embrionárias bovinas. As células bovinas foram plaqueadas em placas de 24 poços (FALCON, USA) a uma concentração de 2×10^5 células.

- Para cada poço, 0,5 µg DNA (pBC1-FIX) foi diluído em 25 µl D-MEM
30 (Invitrogen, USA) sem soro fetal bovino (SFB), 4 µl de Reagente Plus (Invitrogen, USA) e 1 µl lipofectAMINA® (Invitrogen, USA). A solução foi

homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. O meio de cultivo da placa que continha as células (ES cells media) foi retirado e a mistura contendo o vetor de expressão adicionada às células. Após 5 horas de incubação, à 39°C, 5% CO₂, em 100% de umidade, a solução foi substituída por meio de cultivo ES cells media com SFB (Invitrogen, USA).

Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram diluídas 1:10 e isoladas para a manutenção de linhagens clones de células somáticas e de células-tronco embrionárias bovinas. As linhagens clones de células bovinas cultivadas foram criopreservadas em meio contendo 5 mL de ES cells media, 4 mL de Soro Fetal Bovino e 1 mL de DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma, USA) e acondicionadas em botijões de Nitrogênio Líquido a 196°C negativos.

Recuperação e Purificação inicial da proteína

A purificação do produto gênico produzido no leite é realizada por meio da centrifugação em que há a separação da fase lipídica e da fase protéica do leite. Esta recuperação visa à obtenção de uma alta concentração da proteína purificada da matéria prima inicial para as análises preliminares de bioatividade da proteína recombinante (Lisaukas et al., 2008).

A fim de purificar a proteína recombinante em escala industrial e comercial, o composto protéico deve ser isolado via HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Van Cott et al., 1996; Wright & Colman, 1997).

Análises da integração e expressão gênica

Análises moleculares [PCR e *southern blot* (Figura 2); *western blot* (Figura 3)] e bioensaios (Tabela 1) são conduzidos a fim de detectar as linhagens transgênicas, a expressão da proteína recombinante no leite dos animais e sua atividade coagulante.

Análises de *western blot* confirmam a presença da correta massa molecular da proteína recombinante (50 KDa) no leite dos animais transgênicos, certificando a correta estratégia de transformação quando utilizado o vetor de expressão construído, baseado na utilização do sinal de secreção da beta-caseína bovina.

Análises da bioatividade da proteína recombinante

A fim de comprovar a atividade da proteína recombinante em sua ação coagulante, o leite dos animais fundadores da linhagem 01, da linhagem 02, plasma humano normal, plasma humano hemofílico, e leite de fêmeas não-transgênicas foram comparados. A atividade de coagulação detectada em mU/mL (mili-unidades/mililitros) foi 17, 31, 44, 7 e 0, respectivamente. O tempo de coagulação foi estimado em 76, 69, 37.6, 87 e 141 segundos, respectivamente. A atividade da proteína foi estimada em porcentagem de sua ação coagulante (Tabela 1).

10 Bioatividade da proteína recombinante

		Leite da fundadora transgênica Linhagem 01 (R0)	Leite da fundadora transgênica Linhagem 02 (R0)	Plasma Humano Normal	Plasma Hemofílico suplementado com FIX (Sigma)	Leite de fêmea não-transgênica
Western blot		+	+	+	+	-
Atividade de Coagulação	(mU/ml)	17	31	44	7	0
	s	76	69	37.6	87	141

Tabela 1: Atividade de coagulação do FIX recombinante no leite de camundongas transgênicas e não-transgênicas.

15

Texto 1. Código Genético e Sequência polipeptídica do gene do fator IX humano de coagulação sanguínea.

20 Translation of Unknown (1-1320)
Universal code
Total amino acid number: 439, MW=49445
Max ORF: 1-1317, 439 AA, MW=49445

25

1 .
ACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAAT

1 T V F L D H E N A N K I L N R P K R Y N

 61
 5 TCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAG
 21 S G K L E E F V Q G N L E R E C M E E K

 121
 10 TGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGG
 41 C S F E E A R E V F E N T E R T T E F W

 181
 61 AAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGC
 61 K Q Y V D G D Q C E S N P C L N G G S C

 15 241
 AAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTGGAAGGAAAGAACTGT
 81 K D D I N S Y E C W C P F G F E G K N C

 301
 20 GAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGT
 101 E L D V T C N I K N G R C E Q F C K N S

 361
 25 GCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAG
 121 A D N K V V C S C T E G Y R L A E N Q K

 421
 30 TCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAG
 141 S C E P A V P F P C G R V S V S Q T S K

 481
 CTCACCCGTGCTGAGGCTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAA
 161 L T R A E A V F P D V D Y V N S T E A E

 35 541
 ACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTT
 181 T I L D N I T Q S T Q S F N D F T R V V

 601
 40 GGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTT
 201 G G E D A K P G Q F P W Q V V L N G K V

 661
 45 GATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCCACTGT
 221 D A F C G G S I V N E K W I V T A A H C

 721
 50 GTTGAAACTGGTGTGTTAAATTAACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAA
 241 V E T G V K I T V V A G E H N I E E T E

 781
 CATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCTGAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCT
 261 H T E Q K R N V I R I I P H H N Y N A A

841
ATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAAC
281 I N K Y N H D I A L L E L D E P L V L N

5 901
AGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTT
301 S Y V T P I C I A D K E Y T N I F L K F

10 961
GGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTT
321 G S G Y V S G W G R V F H K G R S A L V

15 1021
CTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTC
341 L Q Y L R V P L V D R A T C L R S T K F

20 1081
ACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAA
361 T I Y N N M F C A G F H E G G R D S C Q

1141
GGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATT
381 G D S G G P H V T E V E G T S F L T G I

25 1201
ATTAGTTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCC
401 I S W G E E C A M K G K Y G I Y T K V S

1261
CGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTCACCACCACCACCACCCTAA
421 R Y V N W I K E K T K L T H H H H H H *

Transfecção de células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney Cells)

Preparação do DNA

35 A construção do vetor de expressão foi efetuada de acordo com procedimentos padrões da tecnologia do DNA recombinante (Sambrook et al., 1989). O sistema de transformação das células somáticas MDBK utilizado foi padronizado segundo Oliveira et al. (2005).

40 As células MDBK foram transfectadas com o vetor de expressão denominado pCIneoBeta, construído no nosso laboratório, que contém o gene da beta-galactosidase sob controle do promotor constitutivo CMV e o gene *neo* (seqüência codante da neomicina fosfotransferase) sob controle do promotor constitutivo SV40. Este vetor foi construído introduzindo o gene da beta-galactosidase, após a excisão de sua seqüência codante de seu vetor comercial de origem pCMV-β (7.2 kb) (Clontech, Palo Alto, CA, USA), com a

45

enzima de restrição *NotI* e introduzida no sítio de clonagem do vetor comercial pCI-neo (5,472 pb).

O plasmídio foi amplificado em linhagens de *Escherichia coli* DH5 α e purificado segundo Kit de Purificação de Plasmídios Giga da Quiagen (Quiagen, Valencia, CA, USA). A concentração do DNA plasmidial após a purificação em coluna Quiagen foi mensurada por absorbância sob Ultra Violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A pureza do plasmídio foi assegurada segundo corrida em gel de agarose a 1% e mensuração da relação A260/A280 em espectrofotômetro. O vetor foi seqüenciado e apto para a transformação das células.

Cultivo celular e lipofecção da linhagem MDBK

Linhagens celulares bovinas MDBK foram cultivadas em garrafas de cultura celular (35 cm²), em meio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM L-glutamina, 100 μ g/ml penicilina e 100 μ g/ml estreptomicina à 39°C em 5 % CO₂, 5% O₂ e 93% N₂ em atmosfera úmida; sendo a substituição de meio realizada todas as segundas, quartas e sextas-feiras. As células utilizadas nos experimentos partiram da quinta passagem de cultivo, sendo que as passagens foram realizadas quando a confluência celular atingia em torno de 80%. As células eram removidas da placa de cultura com tratamento de 0,05 % de tripsina-EDTA (1ml/garrafa) por 10 minutos à 39°C. O total das células era centrifugado, ressuspendido e colocado novamente em garrafas de cultivo.

As MDBKs foram plaqueadas numa concentração de 3 $\times$ 10⁵ céls/ml (80-90% de confluência) em placa de 24 poços e transfectadas no dia seguinte, utilizando o lipossomo lipofectAMINA[®] Plus (Gibco, BRL Life Technologies), de acordo com Oliveira et al., 2005.

Para cada poço, 0,5 μ g DNA (pCIneo-beta) foi diluído em 25 μ l D-MEM sem soro fetal bovino (SFB), 4 μ l de Reagente Plus e 1 μ l lipofectAMINA[®]. A solução foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. O meio de cultivo (RPMI 1640 com SFB) da placa que continha as células foi

retirado e a solução (sem SFB) adicionada às células. Após as 5 horas de incubação, a solução foi substituída por meio de cultivo RPMI 1640 com SFB.

Seleção das linhagens MDBKs transgênicas e isolamento de colônias clones

- 5 48 horas após a transfecção, o meio de cultivo RPMI 1640 com SFB foi substituído por meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com SFB e com antibiótico geneticina (G418: 400 µg/ml). Após 20 dias em cultivo seletivo, uma única célula MDBK foi isolada em placa de ELISA (96 poços) para cultivo de linhagem clone transfectada, sob 100 µl de meio RPMI 1640 com geneticina.
- 10 Neste caso, a substituição por meio novo era realizada semanalmente. Quando a cultura atingia a confluência do poço da placa de ELISA, por volta de 15 dias de cultivo, as células eram tripsinizadas e passadas para um poço de uma placa de 24 poços. Permaneciam em cultivo até sua confluência, cerca de 10 dias, e então eram passadas para uma garrafa de cultura. Todo processo de
- 15 seleção foi realizado em meio com antibiótico. As colônias foram expandidas até a totalidade de 6 garrafas de cultura confluentes, sendo que cinco garrafas eram utilizadas para o isolamento do DNA genômico (~36 µg) e uma garrafa era reservada para a congelação das células para a formação de um banco de germoplasma.
- 20 **Deteção da atividade de β -galactosidase**
- 45 dias pós-transfecção, ou seja, antes de começar a expandir as culturas nas garrafas, foram feitos ensaios para a deteção da expressão de β -galactosidase nas células transfectadas, como segurança em expandir apenas as colônias transgênicas. As células que expressaram β -galactosidase foram
- 25 visualizadas por ensaio com B-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside (X-gal). As células foram fixadas com glutaraldeído 50% (Sigma, USA) e com formaldeído 37% por 15 minutos e então incubadas com solução X-gal (0,2% X-gal, 2mmol/l MgCl₂, 5mmol/l K₄Fe(CN)₆, 5mmol/l K₃Fe(CN)₆). O sucesso da transfecção das células foi demonstrado pela coloração azul das colônias
- 30 clones na sua totalidade, após 48 horas de incubação.

Isolamento do DNA genômico

As cinco garrafas de culturas confluentes destinadas ao isolamento de DNA foram tratadas com 0,05% de tripsina-EDTA (1 ml/garrafa) por 10 minutos à 39°C. O total de todas as garrafas foi centrifugado, ressuspendido em PBS (Tampão salina fosfatada) e lavado por mais três vezes com o intuito de retirar o máximo de resíduo do meio de cultivo. O DNA genômico foi isolado segundo McCreath *et al.* (2000), utilizando Kit de isolamento e purificação de DNA genômico (Wizard®).

Técnica de Resgate de Plasmídio em *E. coli*

Dez microgramas de DNA genômico provenientes das linhagens transgênicas clones foram digeridos com enzima de restrição adequada (que contenha apenas um sítio de restrição dentro do plasmídio, de preferência dentro do gene em questão), neste caso enzima *EcoRI* (Invitrogen, USA), durante 3 horas a 37°C. Após a reação, o DNA foi precipitado pela a adição de 3 volumes de Acetato/Etanol, incubado por pelo menos 30 minutos a -20°C e centrifugado por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga refrigerada (14000 rpm). O DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspendido em 110 µl de água milliQ autoclavada. O DNA foi ligado com T4 DNA ligase (Invitrogen, USA) em 400 µl overnight. No dia seguinte, a ligação foi precipitada (mesmo protocolo descrito) em ressuspensão final de 10 µl de água. A ligação foi transformada em células competentes XL1-Blue por eletroporação no sistema BIO RAD de acordo com as especificações do fabricante. O DNA plasmidial das colônias transformantes foi extraído com Kit Quiagen ("miniprep") e posteriormente analisado por perfil de restrição.

Identificação dos transgenes e regiões flanqueadoras

O DNA genômico das células MDBK foi extraído e purificado utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI). Análises de PCR foram conduzidas a fim de confirmar a inserção dos transgenes.

A seqüência dos nucleotídeos dos dois pares de primers utilizados foi: a) para o gene *Amp^r*: AMP 7 (5'-CTTAATCAGTGAGGCACC-3') e AMP 850c (5'-

TCAACATTTCCGTGTCGC-3') para amplificar 860 pb do gene *neo*; e b) para o gene *β-galactosidase*: ER1 β -gal (5'-TACGGCCTGTATGTGGTGGATG-3') e ER2 β -gal (5'-CCAGTGCAGGAGCTCGTTATCG-3') para amplificar 820 pb do gene *gal*. As condições dos ciclos foram: 96°C / 2minutos; 94°C / 30segundos; 56°C / 30segundos; 72°C / 45segundos; X 40 ciclos; + 72°C / 10minutos; 4°C / 24horas. Os produtos de PCR foram analisados por corrida em gel de agarose comprovando a integração dos genes *Amp^r* e *β-gal*.

As regiões do genoma animal em que os transgenes foram integrados foram detectadas a partir do mesmo material proveniente da técnica de resgate de plasmídios, e seqüenciados no seqüenciador automático ABI Prism. As seqüências foram submetidas a análises computacionais utilizando o pacote de programas de biologia molecular GCG. Neste caso, os primers foram desenhados baseados no local da enzima de restrição cujo DNA foi tratado inicialmente e em que provavelmente as regiões flanqueadoras do genoma animal aparecem. As seqüências dos primers são: pCINEOB 1013: (5'→3') CTCTCCACAGGTGTCCACTC e pCINEOB 1252c (5'→3') GTGTCCAGACCAATGCCTCC.

Análises da integração

Análises moleculares e bioquímicas foram conduzidas durante as diferentes etapas do desenvolvimento do projeto, envolvendo ensaios histoquímicos (X-gal), PCR e IPCR. Os protocolos foram efetuados de acordo com as orientações dos fabricantes (Stratagene), tecnologia do DNA recombinante (Sambrook et al., 1989) e segundo Aragão *et al.* (1988).

Neste estudo, nós seqüenciamos a região flanqueadora da integração dos transgenes em 26 linhagens celulares independentes de células MDBK, produzidas por transfecção via lipossomos. Para os 26 clones resgatados, as seqüências foram em tamanho e qualidade suficientes para distinguir ambigüidade no local da inserção no genoma bovino entre as linhagens. Nenhuma correlação foi estabelecida entre o local da integração dos

transgenes e o nível de expressão de beta-galactosidase proporcionado por este local.

Análises de PCR confirmaram a presença de ambos os transgenes, *β-gal* e *neo*, em todas as linhagens clones geradas. Resgates de plasmídios confirmaram a presença de parte do transgene integrado e parte do sítio de integração do genoma bovino (tamanhos variando de 250 a 930 pb) no locus de integração. As seqüências foram comparadas por meio de pesquisas BLAST de DNA genômico feitas manualmente contra o banco de dados do GeneBank utilizando o servidor de web NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os resultados revelaram que os transgenes foram integrados em 12 diferentes cromossomos, sugerindo que não há preferência cromossomal para a inserção do DNA exógeno. Resultados similares foram observados para *Arabidopsis*, em que as inserções foram encontradas em cinco cromossomos (Ríos et al., 2002). A presença da integração do vetor em regiões contíguas foi observada em dois clones B2 e D8. Duas seqüências (B2.4 e A1.5) não apresentaram similaridade com seqüência de bovinos disponibilizadas no GeneBank.

A maioria dos eventos de integração ocorreu dentro de regiões do genoma que são permissivas à transcrição, como observadas pela expressão dos genes da *beta-galactosidase* e o gene da *neomicina*. Entretanto, neste estudo todos os clones foram selecionados sob pressão de seleção positiva (400 µg/ml geneticina), a qual facilitou o isolamento de linhagens transfectadas cuja integração ocorreu em seqüências transcritas. Apesar de a maioria dos transgenes integrar em regiões da cromatina permissivas à transcrição, nós não estabelecemos uma conexão entre a integração e o nível de expressão do transgene proporcionado por estes locais.

Nós determinamos ambas as regiões flangeadoras da linhagem E4. Isto nos permitiu a comparação entre o locus da linhagem transfectada com o locus homólogo na linhagem selvagem. Foi observado que 11 nucleotídeos foram deletados na borda esquerda do sítio de integração do transgene. Este dado revela uma mutação insercional do gene *ed1*, o qual codifica para a proteína

ectodisplasina A. A deleção parcial ou total desse gene causa a doença denominada displasia ectodérmica anidróica em bovinos (Drogemuller et al., 2002). Além disso, outras mutações insercionais foram observadas: no clone CL2 (no gene *RPGR*, associado à degeneração progressiva da retina devido a uma retinite pigmentosa), no clone CL1 (no gene *myo10*, que codifica para a miosina X), e no clone C10.13 (no gene *bmp2*, que codifica para a proteína morfogenética 2 formadora de osso).

A identificação desses tipos de linhagens clones é importante para a prevenção de fenótipos indesejáveis para o nascimento de animais transgênicos ou para a geração de modelos apropriados para estudos de função gênica.

Obtenção das células-tronco embrionárias bovinas

ATIVIDADE	RESULTADOS
Cultivo de feeders cells (monocamada celular), repique e congelação	
Preparo de meio de cultura (Mouse ES cells)	
Cultivo de Mouse ES cells, repique e congelação	As células-tronco embrionárias de camundongos são aptas a receberem tais tratamentos e continuam viáveis após repique e congelação por pelo menos 5 meses de trabalho laboratorial
Cultivo de embriões bovinos <i>in vitro</i> e início da capacitação manual e a laser para tentativa de remoção de células-tronco embrionárias bovinas	A fonte utilizada para a remoção das células-tronco bovinas foi proveniente de embriões D-7 ou D-12, produzidos <i>in vitro</i> (em torno de 25 embriões/ semana) para a demanda de estudos do laboratório
Cultivo de Células-tronco humanas (hESC) transformadas com GFP	Deteção de células transformadas com gene de interesse e isolamento com base na separação a laser.
Aprimoramento das técnicas de remoção de células-tronco embrionárias bovinas e as primeiras colônias	Crescimento de colônias tronco embrionárias bovinas, estabelecimento das culturas e detecção molecular de marcadores tanto para células-tronco quanto para células bovinas.

Tabela 2 – Obtenção de células tronco embrionárias bovinas

- 1) Isolamento e desenvolvimento de colônias clones provenientes de células-tronco embrionárias humanas expressando o gene da GFP (Green Fluorescent Protein);
- 2) Seleção via isolamento a laser e expansão *in vitro* de eventos elites de células-tronco embrionárias humanas, segundo a expressão;
- 3) Criopreservação das linhagens de células-tronco humanas transfectadas;
- 4) O cultivo pós-descongelamento das linhagens de células-tronco humanas transfectadas para a detecção de sua viabilidade e manutenção de sua totipotencialidade.
- 5) Produção *in vitro* de embriões bovinos como fontes doadoras do botão embrionário;
- 6) Isolamento de células-tronco bovinas a partir do botão embrionário de embriões;
- 7) Comparação das duas técnicas de isolamento de células-tronco embrionárias bovinas: isolamento via laser e isolamento manual;
- 8) Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias bovinas aptas para a transfecção *in vitro*;
- 9) Geração das primeiras linhagens celulares bovinas provenientes do isolamento de células-tronco embrionárias bovinas como fontes de núcleos transgênicos, na geração de animais geneticamente modificados para a produção de recombinantes de interesse bioindustrial.

Isolamento de células-tronco embrionárias bovinas

A fonte utilizada para a remoção das células-tronco bovinas foi proveniente de embriões D-7 ou D-12 produzidos *in vitro*.

Foram estabelecidas duas técnicas para a remoção das células-tronco: técnica manual e técnica a laser.

Isolamento Manual (BEM et al., 1987; RUMPF et al., 1992)

Foram utilizados embriões D-7 para a remoção manual de células-tronco.

Utilizou-se um sistema manual de micromanipulação em que as células do botão embrionário foram removidas precisamente por meio de navalhas ultra-

finas (Bio-technology – USA) a fim de causar menor dano às células isoladas por este método.

Foram obtidas 05 colônias-tronco por este sistema de isolamento que foram submetidas a análises moleculares para a certificação da pluripotência celular (compatível com células-tronco).

A técnica consistiu em escolher embriões Grau I de classificação (IETS, 2000), separá-los um a um em gotas individuais para que a remoção do botão embrionário se dê individualmente, evitando a contaminação celular entre embriões.

Uma vez individualizado o botão embrionário, este foi seccionado o mais precisamente possível, evitando a contaminação com as células do trofoblasto do próprio embrião. O trofoblasto inibe o desenvolvimento das células do botão embrionário e não mantém a pluripotência destas.

Imediatamente após a secção, o botão embrionário foi transferido para placas de 04 poços (Nunc, USA), contendo meio ES cells (sem a adição de reagente LIF), em incubadora apropriada. Houve crescimento celular durante os 05 meses de treinamento, em que pudemos observar as primeiras colônias.

Testes subseqüentes foram feitos a fim de detectar marcadores moleculares compatíveis com o desenvolvimento de células-tronco embrionárias bovinas.

Isolamento a laser (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, 2003)

Foram utilizados embriões D-12 para a remoção manual de células-tronco.

Após o D-7 os embriões foram transferidos para a placa de petri apropriada para a manipulação a laser contendo meio ES cells.

Foram cultivados durante 3 dias e incubados na estufa até que os embriões atingissem a fase de eclosão celular.

Uma vez eclodidos, os embriões fixaram-se à membrana da placa utilizada no equipamento a laser e não se moveram no momento da incidência do laser.

Utilizou-se o sistema Laser Pressure Catapulting LPC – P.A.L.M. Microlaser Technologies (Quick Software Guide MB 2.2-0103 (EN) em que as

células do embrião são demarcadas pelo laser, há a incidência de laser às células, o isolamento do grupo celular selecionado e a sucção deste grupo individualizado.

5 O equipamento foi ajustado para tais padrões: inicialmente: Objetiva 40x, Robot LPC; UV Energy slides 37; UV Focus slides 50; ocorrendo ajustes de laser e focus ao longo do processo e a cada novo embrião.

As células removidas por este sistema foram isoladas a cada embrião manipulado e colocadas em placas de 96 poços. A cada semana foram repicadas e removidas para novos poços.

10 Não foram obtidas colônias-tronco por este sistema de isolamento devido a idéia da fixação dos embriões após o cultivo prolongado de 12 dias ter surgido 1 mês antes do término do estágio no exterior.

Este método está em procedimento no laboratório a fim de testar a eficácia deste processo.

15 Um dos objetivos da biotecnologia animal é a aplicação de técnicas atuais da engenharia genética para a produção de animais de grande porte com características desejáveis. Atualmente, genes exógenos podem ser introduzidos no genoma de camundongos via "embryonic stem cells" (*ES cells*) (Nagy et al., 1990) e por meio de técnicas de recombinação homóloga. Neste
20 sistema, as culturas de *ES cells* de camundongos podem ser usadas como uma ferramenta para a adição, a deleção ou silenciamento de genes em locais específicos do genoma. Além disso, *ES cells* têm a capacidade de desenvolvimento estável para formar células derivadas das três camadas de células germinativas embrionárias, e diferenciação bem sucedida *in vitro* em
25 neurônios, em células hematopoiéticas e em músculo cardíaco.

O isolamento de linhagens pluripotentes de *ES cells* humanas de blastocistos tem sido também relatado (Rhind et al., 2003; kim et al., 2005). Em vista da provável contribuição significativa de *ES cells* aos esforços em manipular o genoma, e para substituir vários tecidos e órgãos lesionados,
30 parece apropriado tentar adaptar esta tecnologia à melhoria genética de animais de grande porte e para gerar produtos transgênicos. À exceção dos

camundongos e do homem, os carneiros (Dattena et al., 2006), o porco (Piedrahita et al., 1990), o coelho (Chiang et al., 2007), os bovídeos (Keefer et al., 1994; Verma et al., 2007), o rato (Ouhibi et al., 1995), e o macaco (Mitalipov et al., 2003) tem sido relatados como potenciais fontes doadores de *ES cells*.

5 O método usado para o isolamento de *ES cells* humanas foi adaptado às outras espécies com algumas modificações. Entretanto, tentativas preliminares de cultura da massa interna celular (ICM) de várias espécies sobre camada de *feeders cells* embrionárias de camundongos ou sobre cultura primária de fibroblastos de camundongos na presença do fator inibitório da leucemia (*LIF*)
10 foram raramente bem sucedidas. Uma combinação de fatores de crescimento pode ser requerida para a proliferação destas células pluripotentes, como foi demonstrado no cultivo de células de linhagens primordiais de camundongos (Tielens et al., 2006). No nosso estudo, *ES cells* bovinas, isoladas da massa interna de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, só foi possível quando
15 cultivada sobre camada de *ES cells* de camundongos, fornecendo, dessa maneira, meio de cultivo condicionado por tais células em crescimento concomitante.

Mas o desenvolvimento de linhagens clones de *ES cells* possui a habilidade em ser estudadas seqüências, regulação, ou expressão gênica,
20 geradas a partir de uma única célula, isoladas de tecidos especializados e utilizadas como fontes doadoras das células em estudo.

Com base nisso, a necessidade em se desenvolver técnicas de isolamento de células a partir dos tecidos em estudo, gerou a necessidade de se isolar células-tronco a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro*, como
25 expectativa no uso dos núcleos transfectados para a geração futura de bovinos transgênicos utilizados como biorreatores.

Uma das maiores preocupações no estabelecimento dessa técnica é a tentativa de descartar qualquer possibilidade de contaminação por células circunvizinhas, no momento de seu isolamento. A contaminação é eliminada e
30 as células isoladas podem ser processadas e desenvolvidas como linhagens puras e como fontes potenciais para a transfecção *in vitro*.

Uma vez transfectadas, dentre os trilhões de células geradas como pool no tapete celular, pode-se utilizar a incidência a laser a fim de detectar apenas as células transfectadas desse tapete. Os procedimentos baseados na PCR são usados posteriormente para a amplificação das seqüências de DNA/RNA inseridas (Shutze e Lahr, 1998), enquanto que métodos tais como espectrometria de massa podem ser usados para determinar seqüências de aminoácidos dos polipeptídeos que são gerados pela expressão gênica da linhagem clone gerada (Jimenez et al., 1994).

Além da aplicação potencial da transgenia animal, os biólogos celulares e moleculares têm um objetivo experimental adicional para isolar preparações não contaminadas de células únicas isoladas da cultura de tecidos. Tais células podem ser examinadas, manipuladas, e potencialmente clonadas na tentativa em fornecer mais material biológico para análises e sistemas menos complexos para estudos dos processos biológicos sadios e dos mutantes.

O sistema baseado a laser foi desenvolvido para circunscrever e isolar células vivas a partir de tecido vivo ou células não-viáveis de regiões de tecidos fixos. O método envolve a fixação das regiões do tecido de interesse a uma película termoplástica na qual elas se ligam e crescem. A película usada para a microdissecção e para o isolamento das células é aderida a uma placa de cultura e tratada especialmente para absorver a luz do laser. Desse modo, as células/grupos individuais de células das regiões do tecido que são escolhidas para serem catapultadas são isoladas (Fend et al., 2000), e conseqüentemente colocadas em meio de cultura específico para o desenvolvimento de linhagens clones (Stich et al. 2003).

A técnica a laser fornece a oportunidade de usar células únicas isoladas de tecidos vivos sadios e tumorais para análises funcionais ou na preparação de bibliotecas clonais para investigações diversas na biologia celular, farmacologia, desenvolvimento de drogas, testes ambientais, e para o desenvolvimento de vacinas personalizadas de encontro aos tumores específicos.

A seleção, o isolamento e a análise das células vivas dos tecidos que expressam quimeras das proteínas fluorescentes verdes (GFP) e análises subsequentes de função ou da expressão das células transformadas com GFP são também aplicações possíveis. Nesse estudo, células-tronco embrionárias humanas transfectadas com GFP, foram utilizadas para o teste do isolamento de células individuais via aplicação de laser e a viabilidade celular de crescimento pós-isolamento. O crescimento de colônias clones de células-tronco embrionárias humanas foi possível ao se utilizar as células isoladas via laser e cultivá-las sobre monocamada celular de *fedders cells* de camundongos.

Baseado nisso, a técnica de isolamento via laser e via manual abre uma perspectiva futura viável para a geração de linhagens clones de células-tronco para estudos de função gênica, de expressão gênica e na geração de núcleos transformados com genes exógenos, principalmente de interesse farmacológico, como fontes doadoras desses núcleos para a transferência nuclear e à geração de animais biorreatores.

Cultivo de Fedders cells (Monocamada celular)

A monocamada celular de Fedders cells (fibroblastos de camundongos) é crucial para o preparo do condicionamento do meio de cultivo celular previamente à adição de células-tronco, tanto humanas quanto embrionárias bovinas. Essa monocamada permite a aderência das colônias de células-tronco, além do condicionamento do meio de cultivo em que receberá as células-tronco.

O meio de cultura para as Fedders cells é denominado MEF.

Tabela 3- Meio de Cultura: MEF

D-MEM	405 mL
FCS (Fetal Calf Serum)	75 mL
L-Glutamine	5 mL
NEAA	5 mL
Gentamycin	5 mL

HEPES	5 mL
Total	500 mL

Para o cultivo das células feeders (monocamada) foram utilizadas 5 placas de Petri previamente tratadas com “Ultrapure water with 0,1% gelatin” (filtrada e acondicionada a T°C ambiente). Foi adicionada 10 mL da solução
 5 acima e deixou-se por 30 minutos para o tratamento eficaz das placas que receberam as células feeders.

Descongelou-se uma alíquota de células PMEF-P3 (Neomicina resistente) para o cultivo de 5 placas de Petri. Centrifugou-se e ressuspendeu-se com 5 mL de meio de cultura MEF para feeders cells e adicionou-se 1 mL de meio +
 10 células em cada placa de Petri tratada, completando com 4 mL de meio adicionais/placa.

Incubou-se as placas por cerca de 24 horas antes da adição das Mouse Embryonic Stem Cells.

Para a manutenção das células feeders deve-se repicá-las a cada 2 ou 3
 15 dias de cultivo quando atingem a confluência.

Repique de Embryonic Stem Cells – ES cells (Células-tronco embrionárias)

20 Atingida a confluência das placas contendo células-tronco + Feeders cells, mais ou menos a cada 3 dias de cultivo celular, é necessário a renovação das células e a redução da densidade celular em cada placa de cultura a fim de se evitar a morte por apoptose devido a alta concentração de células.

Para se realizar o repique das células-tronco humanas, de camundongos
 25 e embrionárias bovinas utilizou-se o protocolo a seguir:

- Pré-lavagem das placas com 5 mL de PBS;
- Adicionou-se 5 mL de Trypsin-EDTA na placa contendo ES cells;
- Esperou-se por 10 minutos a 37°C (dentro da incubadora);
- Recolheram-se as ES cells + as células feeders + Trypsin, num tubo Falcon
 30 de 15 mL;

- Adicionou-se 5 mL de ES media no tubo, a fim de paralizar a ação da Tripsina;
- Centrifugou-se por 4 minutos a 1000 rpm;
- Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 10 mL de ES media, homogeneizando bastante para a obtenção de single cells;
- Diluiu-se 1:4 as células;
- Substitui-se o meio de cultura das placas de feeders adicionando-se 5 mL de ES media + ES cells;
- Adicionou-se mais 5 mL de ES media em cada placa;
- Cultivou-se a 37°C, 5% CO₂, com alta umidade.

1X Freezing Media (Meio de Congelação de células)

- A cada repique celular se faz necessária a criopreservação das células em cultura a fim de se evitar algum risco de contaminação posterior da cultura e a perda da passagem celular em que as células se encontravam.

- A identificação de cada passagem é importante para estudos de viabilidade celular em cultura, uma vez que essas células podem ser usadas como doadoras dos núcleos transgênicos utilizando a transferência nuclear.

O meio de congelação das células e o protocolo estão descritos a seguir:

ES media + LIF	5 mL
FCS (Fetal Calf Serum)	4 mL
DMSO	1 mL
Total	10 mL

- Pré-lavagem das placas com 5 mL de PBS;
- Adicionou-se 5 mL de Trypsin-EDTA na placa contendo ES cells;
- Esperou-se por 10 minutos a 37°C (dentro da incubadora);
- Recolheram-se as ES cells + as células feeders + Trypsin, num tubo Falcon de 15 mL;

- Dissociou-se as colônias a fim de congelá-las como single cells;
- Adicionou-se 5 mL de ES media no tubo, a fim de paralizar a ação da Tripsina;
- Centrifugou-se por 4 minutos a 1000 rpm;
- 5 - Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 2 mL de 1X Freezing media pré-resfriado;
- Imediatamente, transferiu-se 1 mL da suspensão para cada vial de congelação;
- Transferiu-se os vials para uma caixa pré-resfriada com Isopropanol no seu interior a -80°C;
- 10 - Após 24 ou 48 horas, transferiu-se os vials para o botijão de Nitrogênio Líquido.

Meio de Células-Tronco embrionárias de camundongo: Knock Out mES Media

- 15 A fim de se cultivar células-tronco embrionárias de camundongos e embrionárias bovinas, o meio de cultivo foi elaborado de acordo com protocolo abaixo:

Knock out D-MEM	300 mL
FCS (Fetal Calf Serum)	54 mL
NEAA	2.4 mL
L-Glutamine	2.4 mL
Gentamycin	0.4 mL
B-Mercaptoethanol	250 µL
LIF	30 µL
Total	300 mL

* Homogeneizar e filtrar 0.22 µ

20

O Meio de Cultura base é preparado e acondicionado a 4°C.

Deve-se filtrar o meio após fazê-lo e acondicioná-lo por no máximo 2 semanas.

O Reagente LIF é utilizado em adição à monolayer (fedders) para a manutenção da totipotência das células.

Células-tronco embrionárias humanas: hESC - Culture Media

- 5 A fim de se cultivar células-tronco embrionárias humanas, o meio de cultivo foi elaborado de acordo com protocolo abaixo:

D-MEM F12 Media	200 mL
Knockout Serum Replacer	50 mL
L-Glutamine (200 mM)	1.25 mL
NEAA (100X solution)	2.5 mL
Gentamycin	0.4 mL
B-2-Mercaptoethanol (BME)	0.85 µL
B-FGF stock solution (in the freezer)	0.5 mL

* Homogeneizar e filtrar 0.22 µ

10 Solução estoque B-FGF (Basic Fibroblast Growth Factor – bFGF, human recombinant, Invitrogen, USA)

- Preparou-se 0.1% BSA em DPBS:

- 0.3 g BSA em um tubo Falcon de 50 mL.

- adicionou-se 30 mL de DPBS e homogeneizou-se bem.

15 - Separou-se 5 mL da solução 0.1% BSA em DPBS:

- Tubo B-FGF (10 µg) e homogeneizou-se.

- Aliquotou-se 500 µL em cada eppendorf e identificou-se;

- Acondicionou-se a – 20 °C.

20 Cultivo de Células-Tronco embrionárias humanas modificadas com proteína fluorescente verde (GFP) with Green Fluorescent Protein hESC (ATCC – PubMed: 12529550)

O meio hESC foi condicionado em MEF media durante 24 horas para ser utilizado em placas contendo as colônias GFP hESC.

A cada 24 horas o meio MEF era coletado (18 mL), adicionado B-FGF (140 μ L), filtrado e adicionado às placas contendo a cultura das células GFP_hESC.

5 Isolamento das células GFP_hESC via laser

1. Detecção do tapete de células-tronco embrionárias humanas transformadas com GFP, baseada na fluorescência das células após excitação com Ultra-violeta e filtro de visualização verde;

2. Imediatamente após a detecção das células potencialmente modificadas, foi ajustado o equipamento a laser nas seguintes especificações: Objetiva 10X; Robot LPC; UV Energy slides 46; UV Focus slides 73;

3. Foi aplicado o laser às células e recolhidas no “cap” (pequena quantidade de meio de cultura para o acondicionamento de apenas 1 célula) do equipamento;

4. Imediatamente após a colheita, as células foram colocadas em placas de Elisa para o crescimento isolado das colônias humanas com GFP.

Cultivo de embriões bovinos *in vitro*

(Greve et al., 1991; Krimpenfort et al., 1991; Carolan et al., 1992; Bols et al., 1995; Peixer et al., 1997; Rumpf et al., 2000)

O Cultivo *in vitro* de embriões bovinos foi realizado no Laboratório sob responsabilidade do Dr. Rick Monson e supervisão do Dr. Dave.

O protocolo utilizado foi desenvolvido no próprio laboratório dos pesquisadores, baseado nas diversas bibliografias sobre o assunto. Devido a isso, o protocolo não foi autorizado para a descrição de seus componentes.

Foi produzido um total de 260 embriões conforme tabela abaixo:

Tabela 3. Produção de embriões *in vitro* como fonte do botão embrionário para a remoção das células-tronco embrionárias bovinas.

Data	Ovócitos/clivagem	D7 Blastocistos	D8 Blastocistos
5/Set	76	11	7
12/Set	58	12	5
19/Set	59	12	9
2/Out	83	14	10
9/Out	38	0	3
16/Out	56	----	15
23/Out	77	7	5
30/Out	131	10	11
6/Nov	154	7	17
13/Nov	144	----	30
20/Nov	105	0	9
27/Nov	119	11	19
4/Dez	124	9	17
11/Dez	61	10	----
TOTAL	1285	260 embriões	

PROCEDIMENTOS FIV

DIA -2: Aspiração folicular

- Os ovários eram coletados em um frigorífico, e transportados em caixas térmicas em torno de 30 °C, por meio de transporte aéreo;
- No laboratório, eram lavados em água corrente e aquecida em torno de 35 °C e prontos para serem aspirados;
- Eram utilizadas agulhas descartáveis calibre 40x12 para a aspiração dos folículos sob vácuo de aproximadamente 10 mmhg;
- Os ovócitos eram coletados em tubos Falcon de 50 mL, e quando repletos, eram imediatamente transferidos para placas de Petri grande para serem rastreados e avaliados;
- A medida que os ovócitos eram selecionados, eram colocados em placas de Petri pequenas, contendo o meio de seleção de ovócitos apropriado (Protocolo não autorizado a ser divulgado).

DIA -1: Maturação dos ovócitos

1. Após serem selecionados, os ovócitos de graus 1, 2 e 3 eram colocados em placas contendo gotas de meio de cultura apropriado para a maturação ovocitária (Protocolo não autorizado);
- 5 2. Ficavam durante 18 a 24 horas dentro de incubadoras apropriadas para a maturação.

DIA 0: Fertilização dos ovócitos maturados

1. Os ovócitos maturados por 24 horas eram pré-lavados (para a remoção de qualquer resíduo de meio de cultura de maturação) e eram
- 10 transferidos para outras placas contendo gotas de meio de cultura apropriado para a fertilização ovocitária (Protocolo não autorizado);
2. O sêmen era preparado por meio de gradiente específico para a separação de espermatozóides viáveis para a fertilização dos ovócitos;
3. As gotas inseminadas eram colocadas durante 24 horas em incubadora
- 15 apropriada para a fertilização;

DIA 1 ao DIA 7: Cultivo dos embriões

1. Os ovócitos fertilizados por 24 horas eram pré-lavados (para a remoção de qualquer resíduo de meio de cultura de fertilização) e eram
- 20 transferidos para outras placas contendo gotas de meio de cultura apropriado para o cultivo embrionário (Protocolo não autorizado);
2. Os embriões eram cultivados durante 7 dias em incubadora apropriada para o desenvolvimento embrionário;
3. No Dia 7, uma parte dos embriões era disponibilizada para o laboratório de Stem Cells, sob a supervisão da Dra Gabriela Cezar, para a tentativa
- 25 de isolamento manual de células-tronco embrionárias bovinas;
4. A outra parte era cultivada até o Dia 10, em meio de cultivo apropriado para ES cells, em que os embriões, então, eram utilizados para o isolamento a laser de células-tronco embrionárias bovinas.

- 30 A construção do vetor de expressão foi efetuada de acordo com procedimentos padrões da tecnologia do DNA recombinante (Sambrook et al.,

1989). O sistema de transformação de células somáticas foi padronizado segundo Oliveira et al. (2005) e aplicado para os Fibroblastos bovinos (paper 5).

O vetor de expressão comercial pCI-neo (Promega, Madison, WI, USA) foi usado para a transfecção estável dos fibroblastos bovinos. Este vetor carrega o gene da neomicina fosfotransferase sob controle do promotor constitutivo CMV e seqüência poli-A.

O plasmídio foi amplificado em linhagens de *Escherichia coli* DH5 α e purificado segundo Kit de Purificação de Plasmídios Giga da Quiagen (Qiagen, Valencia, CA, USA). A concentração do DNA plasmidial após a purificação em coluna Quiagen foi mensurada por absorbância sob Ultra Violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A pureza do plasmídio foi assegurada segundo corrida em gel de agarose a 1% e mensuração da relação A260/A280 em espectrofotômetro.

Geração dos bovinos transgênicos

As etapas de: a) Obtenção de linhagens de fibroblastos bovinos provenientes de animais de aptidão leiteira, aptas à transfecção *in vitro*; b) Transfecção e isolamento de linhagens clones doadoras; c) Seleção dos eventos elites; foram conduzidas segundo Oliveira et al., 2005.

As etapas de: d) Preparação das células doadoras; e) Citoplasma receptor (ovócitos coletados *in vivo* e *in vitro*) de animais de raças leiteiras; f) Enucleação (Micromanipulador); Transferência da célula doadora transgênica e fusão ao citoplasma receptor (por estímulos elétricos); g) Ativação artificial e cultivo embrionário *in vitro*; h) Avaliações do desenvolvimento (taxa de clivagem e taxa de blastocistos); i) Transferência dos embriões para vacas receptoras; estão descritas no paper 5 para a geração de bovinos transgênicos utilizando fibroblastos geneticamente modificados como fontes doadoras de núcleos transgênicos por meio da técnica de transferência nuclear.

Preparação de células doadoras

Células de fibroblastos transfectadas foram plaqueadas a uma concentração de 0.5×10^5 células em placas de 24 poços e cultivadas em meio

de cultura FAEX + 10% Soro fetal bovino, até atingir 100% de confluência. Após, o meio de cultura foi substituído pelo meio com teor reduzido de soro (5%) e as células incubadas a 38°C, 5% CO₂, durante 4-8 dias até a transferência nuclear. Imediatamente antes da transferência nuclear, as células

5 doadoras foram coletadas por meio de tripsinização utilizando 0.05% tripsina-EDTA, lavadas duas vezes, e ressuspensas em meio contendo 1% soro de albumina bovina (BSA).

Citoplasma receptor

Os ovócitos que foram utilizados eram provenientes de vacas vivas e de

10 ovários de abatedouro. No primeiro caso, foram coletados por meio de punção folicular guiada por ultra-som de vacas separadas para esta finalidade. Enquanto que folículos de 2 a 8 mm foram puncionados de ovários provenientes de abatedouro por um sistema a vácuo. Os complexos cumulus-ovócitos (CCO's) com citoplasma homogêneo e mais de 5 camadas de células

15 da granulosa foram selecionados. Destes, foram separados grupos de vinte a trinta que foram colocados em poços contendo 400 µl de meio de maturação *in vitro* (MIV) coberto com óleo mineral e incubados a 39°C, 5% CO₂ em atmosfera com umidade saturada. O meio de maturação (MIV) consistiu de

20 TCM 199 suplementado com 10% v:v de soro fetal bovino (SFB), 0,1 U/ml de FSH, 0,1 U/ml de LH, 0,1 mg/ml de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina. Após 22 a 24 horas do início da maturação, os CCO's foram desnudos por meio de pipetagens em solução de hialuronidase a 0,2%.

Enucleação

Antes de seguirem para a enucleação, os ovócitos foram colocados em

25 meio de bancada acrescido de corante vital Hoechst 33342 e citocalasina D por 10 a 15 minutos. O meio de bancada consistiu de TCM 199 com Hepes adicionado de 10% v:v de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina.

Os ovócitos foram manipulados em meio de bancada suplementado com citocalasina D.

30 Para verificar a retirada da placa metafásica e do primeiro corpúsculo polar, a biópsia succionada por meio de uma pipeta de 25 a 30 µm de diâmetro

foi exposta à luz ultravioleta (UV). A cromatina corada com Hoechst 33342 quando exposta à UV fluoresce sob a luz, comprovando o procedimento correto.

Transferência da célula doadora e fusão

5 Os fibroblastos transfectados foram introduzidos no espaço perivitelíneo do ovócito enucleado. Em seguida, os complexos citoplasma-fibroblasto foram alinhados entre dois eletrodos e submetidos a dois pulsos DC (corrente direta) de 1,5 kV/cm por 50 µseg. Estes estímulos elétricos foram aplicados em
10 solução a 0,28M de manitol, 0,1 mM de MgSO₄ e 0,05 mM de CaCl₂ com o intuito de promover formação temporária de poros nas membranas plasmáticas, induzindo assim a fusão das duas estruturas. Após a eletrofusão os embriões reconstruídos passaram por banhos em meio de bancada e posteriormente foram colocados em meio de cultivo.

Ativação artificial e cultivo embrionário

15 Três a cinco horas após a aplicação dos pulsos elétricos foi conduzida a ativação do complexo citoplasma-fibroblasto. Estes foram incubados em solução 5 µM de ionomicina por 4 a 5 minutos ou então em solução de etanol a 7% por 5 minutos. Em seguida, as estruturas passaram por banhos de meio SOFaa (Synthetic Oviduct Fluid) e foi avaliada a taxa de fusão antes de serem
20 transferidas para a placa de cultivo. O cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões reconstruídos foi realizado em poços contendo 400 µl de meio SOFaa suplementado com 5 % v:v de SFB, 0,5 mg/ml de mio-inositol, 0,1 mg/ml de citrato tri-sódio, 0,1 mg/ml de L-glutamina, 20 aminoácidos essenciais e 7 não essenciais. O meio SOFaa conteve uma camada de 400 µl de óleo mineral
25 cobrindo-o. O CIV foi realizado a 39°C, 5% de Cos, 5% de O₂ e umidade saturada.

Avaliações do desenvolvimento e transferência dos embriões

Após 48 horas da eletrofusão, a taxa de clivagem dos embriões foi avaliada. O cultivo *in vitro* seguiu até 7 a 8 dias após a fusão, quando então foi
30 verificada a taxa de blastocisto. Os embriões foram transferidos pelo método não-cirúrgico para vacas receptoras que tiveram idade uterina sincronizada

com a do embrião. Estas vacas ficaram sob observação quanto ao retorno do cio e tiveram a prenhez confirmada por ultra-sonografia com 30 a 35 dias de gestação.

5 PCR e Southern blot foram conduzidos a fim de detectar a integração estável do transgene tanto nas células doadoras quanto nas células dos fetos transgênicos.

 Os nossos resultados mostraram que a transfecção de células somáticas doadoras dos núcleos transgênicos não influencia negativamente as taxas de eficiência da produção *in vitro* de embriões após o processo de TN (porcentagem de fusão, clivagem e blastocistos), do mesmo modo que
10 concluíram Roh et al. (2000) e Han et al. (2001) para bovinos. Da mesma maneira, dados publicados de fibroblastos fetais de porcos transfectados com o gene EGFP (enhanced green fluorescent protein) (Koo et al., 2001; Martinez Diaz et al., 2003) corroboraram nossos achados. Entretanto, resultados
15 similares têm sido contraditórios em bovinos, mesmo com dados do mesmo grupo de pesquisa. Arat et al. em 2001 relataram eficiências similares entre células da granulosa de animais adultos transfectadas e não-transfectadas em suas taxas de clivagem e taxas de blastocistos. Já Arat et al. em 2002 demonstraram que linhagens de células adultas e fetais expressando EGFP
20 apresentaram capacidade de desenvolvimento *in vitro* de embriões após a TN mais baixas quando comparadas com as mesmas linhagens de células transfectadas, porém não expressando EGFP. Mais exemplos e resultados contraditórios têm sido observados em bovinos; alguns artigos (Zakhartchenko et al., 2001; Bhuiyan et al., 2004) indicam uma significativa diminuição nas
25 taxas de blastocistos quando usadas células transfectadas comparadas com células não-transfectadas, enquanto que outros autores não reportaram tais diferenças (Brink et al., 2000; Brophy et al., 2003). Zakhartchenko et al. (2001) atribuíram as baixas taxas de desenvolvimento embrionário pós-reconstrução, com fibroblastos fetais transfectados, aos longos períodos de cultura
30 requeridos para a transfecção e seleção dos eventos elites, mas não ao transgene *per se*.

Provavelmente, as diferenças entre resultados reportados até agora são devidos mais precisamente ao tipo de vetor de expressão, protocolos de transfecção celular (Bhuiyan et al., 2004), métodos de TN e condições da cultura das células doadoras de seus núcleos transgênicos (Wells et al., 2003; 5 Miyoshi et al., 2003). Além disso, o local de integração do transgene usado e sua possível interferência na expressão de genes endógenos podem influenciar nos resultados (Hodges and Stice, 2003).

No nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas nas taxas iniciais de prenhez (< que 40 dias de gestação) entre células doadoras 10 de núcleos transfectados e não-transfectados, relatado também por Zakhartchenko et al. (2001). Por outro lado, Forsberg et al. (2002) reportaram taxas mais baixas de prenhez inicial pós TN por células doadoras transfectadas do que por células não-transgênicas. No nosso trabalho, o pequeno número de animais receptores gestando embriões clonados transgênicos e não- 15 transgênicos impossibilita resultados conclusivos acerca da sobrevivência dos embriões transgênicos ou não-transgênicos a termo. O decréscimo nas taxas de gestação encontradas com embriões transfectados podem ser em parte explicadas pelo aumento da incidência de apoptose celular nos blastocistos produzidos a partir de longos períodos do cultivo das células doadoras dos 20 núcleos para a TN como também relatado por Jang et al. (2004). Estes autores também relataram que o desenvolvimento de parâmetros *in vitro* (taxas de blastocisto e contagem celular de blastocisto) não são afetados por períodos prolongados das culturas celulares.

As linhagens de fibroblastos utilizadas em nosso estudo foram isoladas de 25 pele de orelha de uma bezerra de clone embrionário (Sousa et al, 2000; Iguma et al., 2001). Esta linhagem celular foi eleita devido a resultados superiores em pre-experimentos para esse propósito. Dentre esses, cariotipagem (dados não mostrados) e alta eficiência de transfecção (60-70%; Oliveira et al., 2005).

Para a finalidade da clonagem de animais transgênicos, o uso de células 30 somáticas adultas é mais aconselhável do que o uso de células fetais, especialmente quando a escolha permite selecionar animais com

características de alta produção (alta produção leiteira e alta taxa de crescimento), mérito genético valorado e sanidade animal assegurada.

Uma vez que o vetor de expressão utilizado pCI-neo possui um único sítio de restrição para *Bam*HI, análises de Southern blot dos fetos transgênicos foram realizadas no intuito de confirmar a integração do transgene, além de evidenciar a presença de apenas uma cópia integrada no genoma bovino. Ambos os fetos apresentaram o mesmo padrão de integração, uma vez que foram gerados a partir da mesma linhagem celular transfectada.

Em suma, o trabalho não encontrou diferenças significativas entre as taxas de desenvolvimento embrionário após TN, quando comparadas linhagens doadoras de núcleos transfectados e não-transfectados. Em outras palavras, os resultados não mostraram efeitos deletérios quando do uso da técnica de transfecção celular, até a idade gestacional de 40 dias, em que os fetos transgênicos foram extirpados para análises moleculares do transgene.

BMP-2 e BMP-4

cDNA dos genes *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) e *bone morphogenetic protein-4* (BMP-4) foram sintetizados a partir de RNA total extraído de tecidos ósseos de pacientes que apresentavam trauma facial (fraturas no maxilar entre o 7º e o 10º dia pós-trauma) e clonados num vetor para expressão em células de mamíferos, sob controle do promotor de citomegalovírus (CMV). Os vetores contendo os genes BMP-2 e BMP-4 foram utilizados para a transfecção de fibroblastos bovinos. mRNAs foram indiretamente detectados por RT-PCR nas células transfectadas. As proteínas BMP-2 e BMP-4 foram detectadas mediante análises de Western Blot. Os resultados demonstram a possibilidade de produção desses fatores de crescimento celular em fibroblastos bovinos. Essas células poderão ser utilizadas como fontes doadoras de material genético para a técnica de transferência nuclear na geração de animais transgênicos.

RNA total foi isolado do tecido ósseo dos referidos pacientes. RNA foi isolado usando Trizol e a síntese de cDNA foi realizada com o kit Superscript II, de acordo com as instruções do fabricante.

Os genes BMP foram amplificados por PCR usando primers para BMP-2 (F=GTGCTTCTTAGACGGACTGC e R= GTACTAGCGACACCCACAAC) a fim de amplificar 1,233 pb do gene BMP-2 e BMP-4 (F=AGCCATTCCGTAGTGCCATC e R=AAGGACTGCCTGATCTCAGC) para amplificar 1,373 pb do gene BMP-4.

Cada reação de PCR foi realizada em misturas de 25 µl contendo 60mM de Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM de sulfato de amônia, 2mM de MgSO₄, 200 µM de cada dNTP, 200 µM de cada primer, 1U de polimerase de alta fidelidade Taq platinum. A mistura foi depositada sobre óleo mineral, desnaturada por 2 min em 94°C em um ciclador termal MJ Research e amplificada por 30 ciclos (94°C por 15 s, 55°C por 30s, 68°C por 2 min). Os produtos foram corridos em gel de agarose 1%, marcados com brometo de etídio e visualizados em luz UV. As seqüências de DNA amplificadas foram clonadas com vetor pGEM-T e seqüenciadas. Os genes foram então clonados no sítio de restrição NotI no vetor pCMV-B, substituindo o gene da B-galactosidase, sob controle do promotor citomegalovírus (CMV) para expressão em células mamíferas para gerar vetores pCMV-BMP2 e pCMV-BMP4.

Fibroblastos bovinos são transfectados com os vetores pCMV-BMP2 e pCMV-BMP4 usando LipofectAmine Plus, de acordo com as instruções do fabricante. A fim de detectar os genes de expressão BMP-2 e BMP-4 (mRNA) nas células de fibroblastos transgênicas, RT-PCR foi realizado. O isolamento do RNA total e PCR foram conduzidos como previamente descrito. Amplificação RT-PCR de BMP-2 e BMP-4 foram realizadas em 3 linhagens de fibroblastos independentes. RT-PCR com RNA total sem a síntese de DNA não revelou amplificação, atestando a ausência de contaminantes na amostra. Western-blot foi realizado como descrito previamente, usando anticorpos monoclonais, que revelaram a produção das proteínas BMP-2 e BMP-4.

Análise de RT-PCR de fibroblastos bovinos transfectados com os vetores pCMV-BMP2 (A) e pCMV-BMP4 (B). Fileira 1: 1kb Ladder; Fileiras 2-4:linhagens celulares de fibroblastos transfectadas; Fileira 5: Linhagens

celulares de fibroblastos não-transfectados; Fileira 6: RNA total sem síntese de DNA.

Análise de Western-Blot mostrando a presença das proteínas BMP-2 e BMP-4 em fibroblastos bovinos transfectados.

5

Lipossomos para transfecção de fibroblastos

Desenvolvimento de sistema de transfecção eficiente em células utilizando lipossomos, especialmente em fibroblastos, caprinos, ovinos e bovinos, estabelecendo uma fundação para utilização de células de fibroblasto transfectadas para gerar animais transgênicos através de tecnologia de transferência nuclear e estudos de função de genes.

10

Cultura de células de fibroblasto

- Biópsia da pele da orelha de bovinos, caprinos e ovinos.

- Amostras lavadas 3 x com 1 ml de PBS gelado suplementado com penicilina (100IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Os fragmentos da pele foram lavados 4 x com 1 ml de solução de Tripsina (tripsina 0,05% p/v e EDTA 0,02% p/v) e transferidos para garrafas de cultura de células contendo 4 ml de D-MEM, 10% de soro fetal, penicilina e estreptomicina. Células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem 70% de confluência. Células crescidas foram tripnizadas e transferidas para novas garrafas de cultura de células sem os fragmentos de pele originais.

15

20

Vetores

- Foi utilizado pCMVB, vetor que carrega o gene da b-galactosidase sob o controle da sequência promotora CMV e uma sequência poli-A.

25

- Foi também utilizado o vetor pCI-neo para permitir transfecções estáveis, que carrega o gene de fosfotransferase de neomicina sob controle da sequência promotora CMV e uma sequência poli-A.

- Plasmídeos foram amplificados com linhagem DH5α de E. coli e purificados usando Qiagen Plasmid Giga Kit. Concentrações de DNA plasmídico foram medidas por absorção UV 260 nm e pureza do DNA

30

plasmídico foi acessada usando eletroforese com gel de agarose e proporções A260/A280.

Parâmetros afetando as transfecções transientes de células de fibroblasto bovinas, ovinas e caprinas

- 5 Diversos parâmetros foram medidos, como: 1) Eficiência da transfecção celular DNA/lipossoma; 2) Efeito da densidade celular na taxa de transfecção utilizando culturas bovinas de fibroblastos; 3) Efeito do vetor plasmídico na eficiência de transfecção em células de fibroblastos bovinas.

Ensaio bioquímico de β -galactosidade

- 10 - Expressão de β -galactosidade foi detectada 24 horas após a transfecção, sendo calculada sob microscópio óptico (100X).

Transfecção estável de fibroblastos

- 15 Células de fibroblastos bovinos foram crescidas em placas de cultura e transfectadas com 0,5 μ g pCI-neo e Lipofectamina (8,3 μ l/ml) com reagente Plus (13.3 μ g/ml). 48 horas após a transfecção, células foram diluídas 1:10 e G418 foi adicionado para chegar a concentração final de 0,5 mg/ml. Células transfectadas atingiram subconfluência após 7 dias de seleção. Na terceira passagem, uma porção das células foi diluída 1:10, cultivadas sob pressão seletiva de antibióticos e criopreservados. A outra porção foi diluída 1:1000 e
- 20 cultivadas sob pressão seletiva de antibióticos por 7 dias. Colônias individuais foram isoladas e expandidas para criopreservação, contagem de cromossomos e análise por PCR.

Análise por PCR

- 25 Dna genômico de duas linhagens de fibroblastos bovinos transfectados e não-transfectados foram extraídos e purificados. DNA genômico foi usado como molde nas reações de PCR contendo primers específicos do gene neo (420 pb): NPT151 (5'-ATGATTGAAGAAGATGGATTG-3') e NPT941 (5'-GAAGAACTCGTCAAAGAAGGCC-3'). A reação de PCR foi feita em um volume final de 25 μ l contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM
- 30 MgCl₂, 160 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada primer e 2U Taq polimerase. A reação de PCR compreendeu 35 ciclos (94C/1min; 60C/1min, 72C/1min) em

ciclador termal PT-100. Produtos de PCR amplificados foram analisados em 1,5% de gel de agarose com brometo de etídio (50 mg/ml) e as respectivas imagens foram digitalizadas.

- Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e
- 5 poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GERADAS POR CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS MODIFICADAS.

1. Processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas caracterizado por compreender as etapas de:

a) construir vetores de expressão compreendendo:

a1) pelo menos uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene do fator IX de coagulação sanguínea humano e/ou seus fragmentos contendo peptídeo sinal bovino na extremidade 5';

a2) pelo menos um promotor adequado;

b) contactar células-tronco embrionárias bovinas com os vetores de expressão de a).

2. Processo de purificação de proteínas geradas por células-tronco embrionárias bovinas modificadas caracterizado por compreender as etapas de:

a) acoplar cauda de histidina a extremidade 3' de pelo menos uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene do fator IX de coagulação sanguínea humano e/ou seus fragmentos compreendendo peptídeo sinal bovino na extremidade 5' presente em células-tronco embrionárias bovinas;

b) purificar a), permitindo a separação da proteína gerada pelas células-tronco embrionárias bovinas.

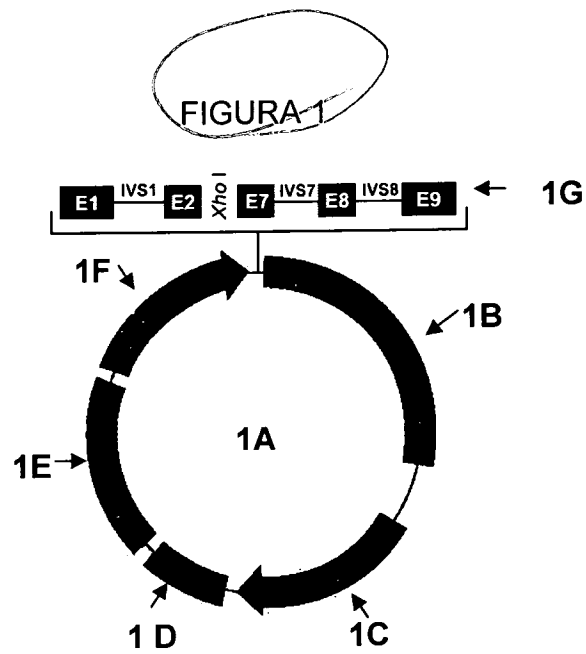


Figura 2

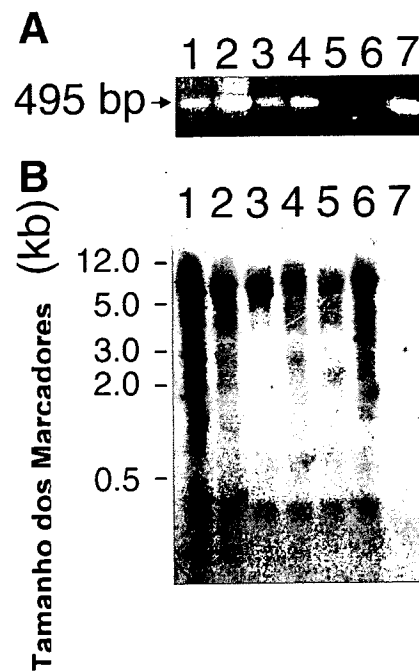


Figura 3

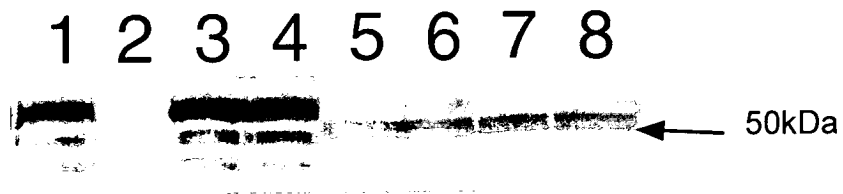


Figura 4

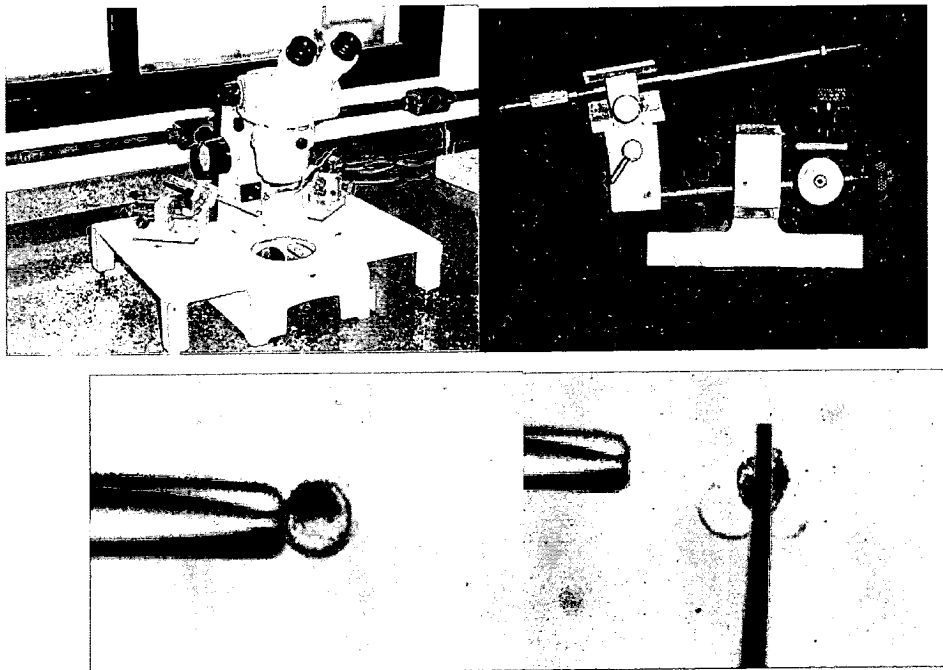


Figura 5

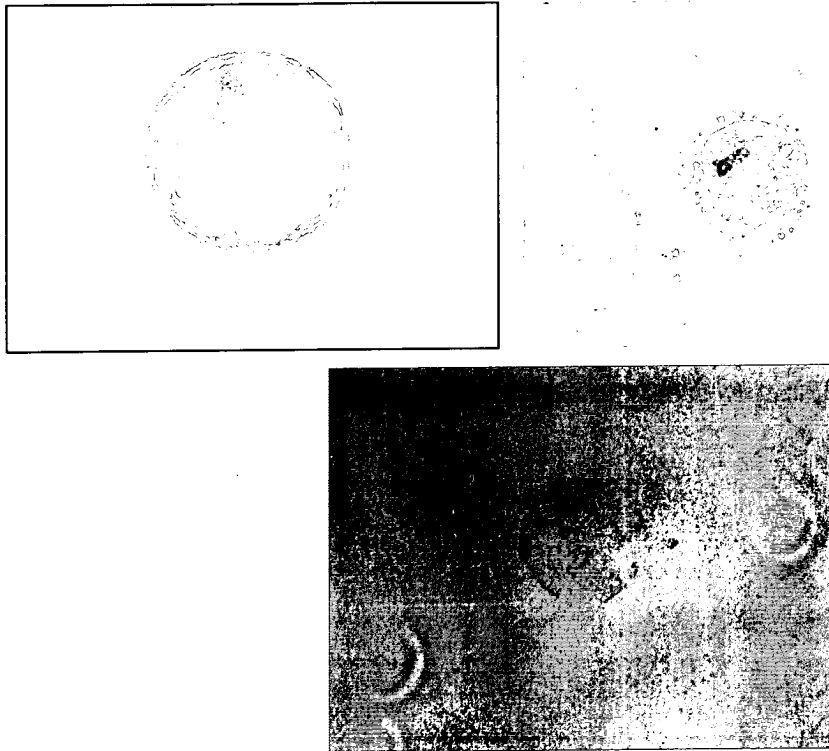


Figura 6

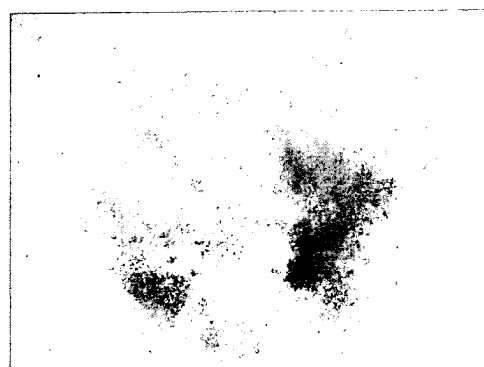
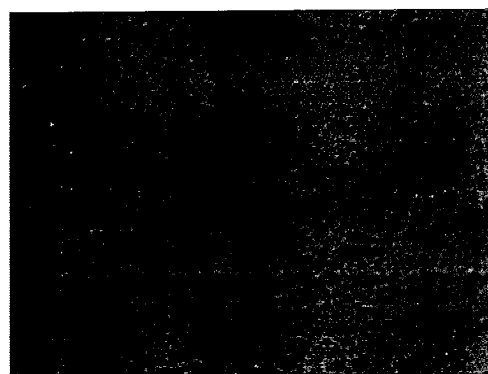
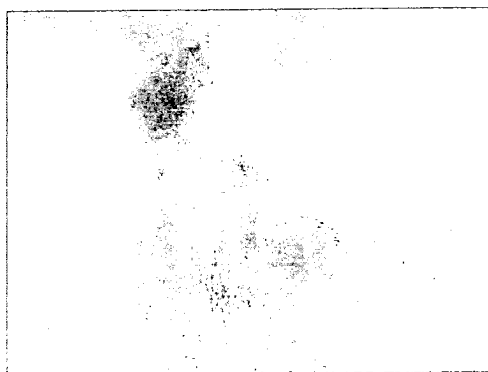
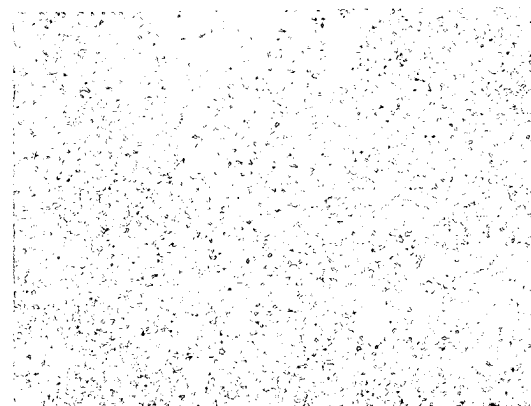
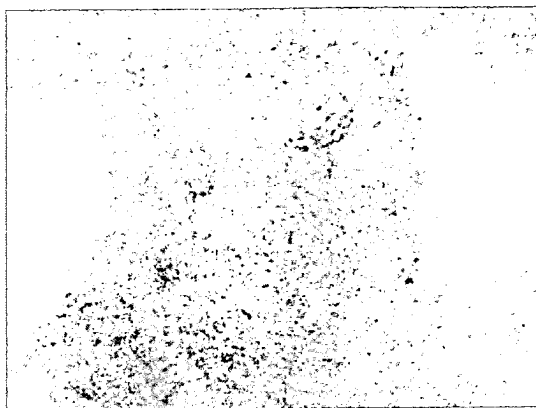


Figura 7

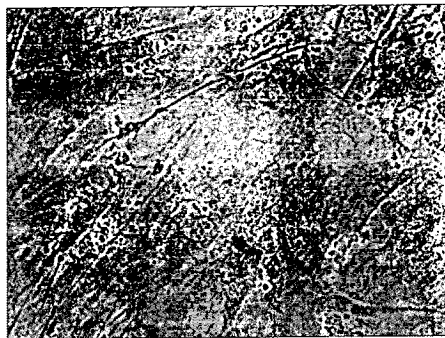
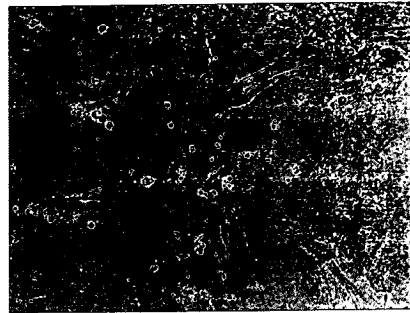


Figura 8

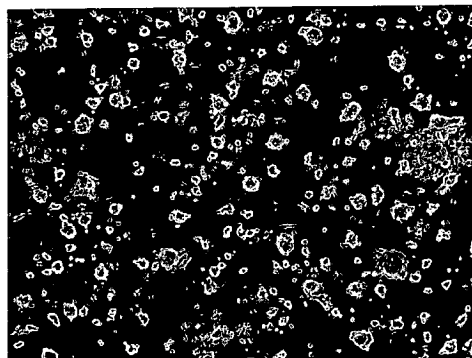


Figura 9

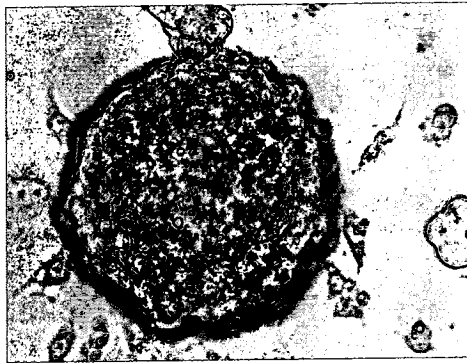
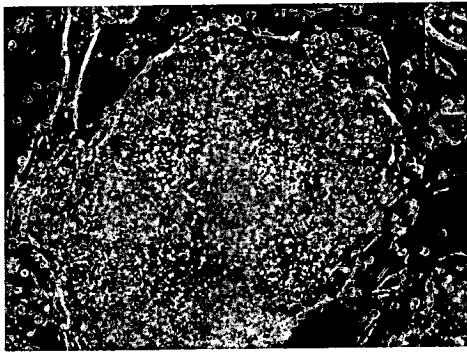
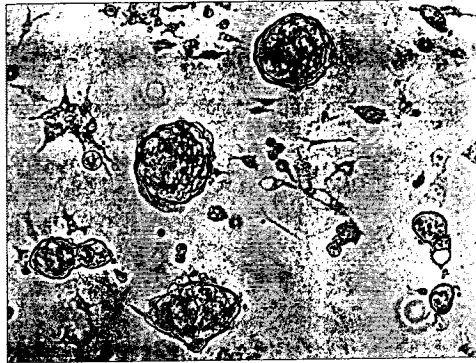


Figura 10

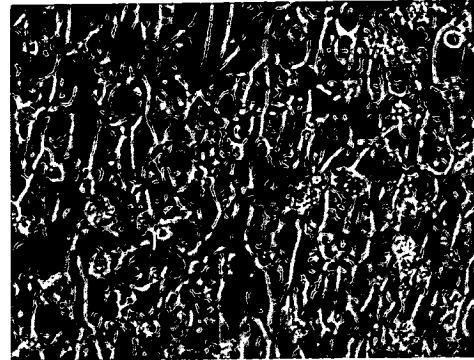
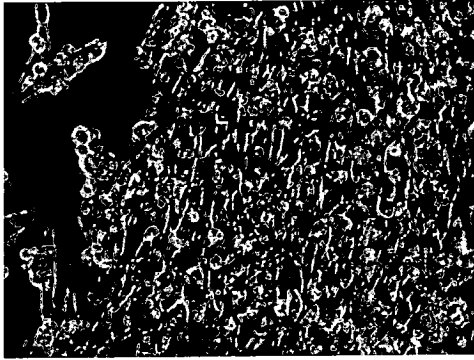


Figura 11

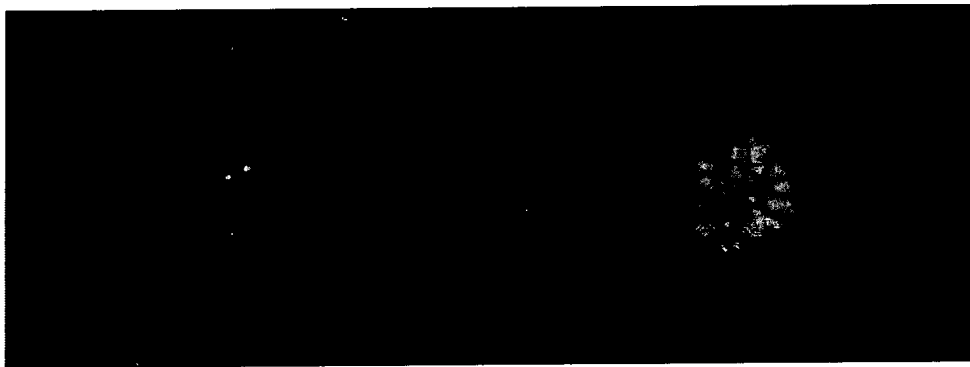
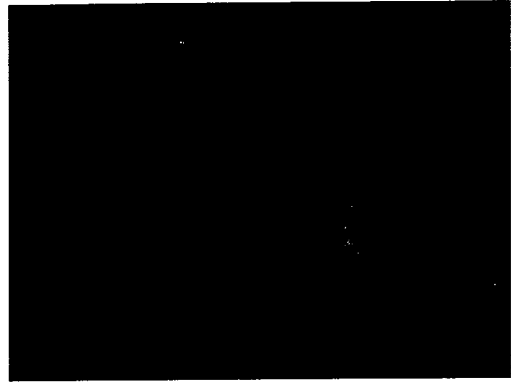
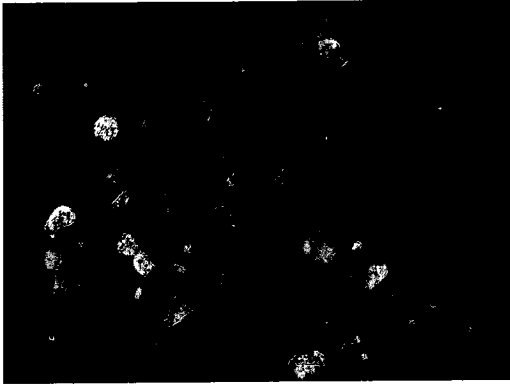


Figura 12

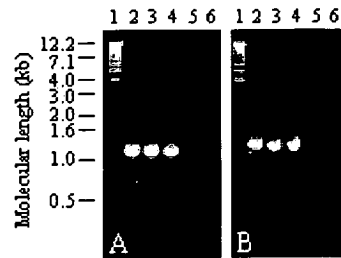


Figura 13

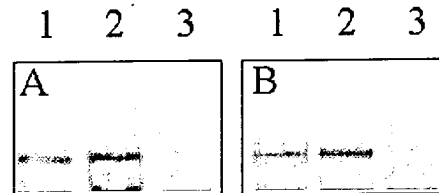
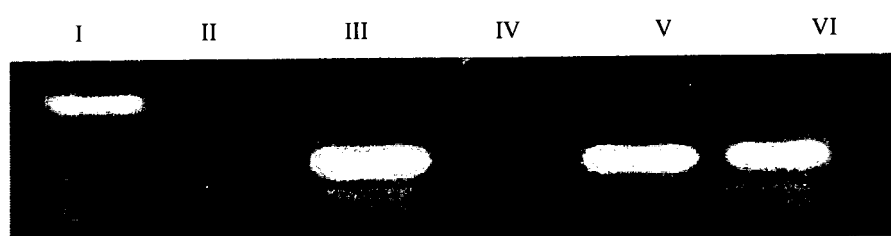


Figura 14



Figura 15



Resumo

PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS
BOVINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GERADAS POR
CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS BOVINAS MODIFICADAS.

A presente invenção está relacionada ao processo de modificação de células-tronco embrionárias bovinas e processo de purificação de proteínas geradas por células-tronco modificadas. Em especial, a presente invenção se situa no campo da terapêutica médica e veterinária.