

# MANUAL DE BIOSSEGURANÇA

dezembro de 2001



# Parte IV

# Manipulação de

# Animais

---



## Sumário

<b>18.</b>	<b>Animais de Laboratório.....</b>	<b>329</b>
18.1.	Saúde das Espécies Convencionais de Laboratório .....	329
18.2.	O Controle Sanitário .....	331
18.3.	Modelos Animais de Doenças Humanas .....	333
18.3.1.	As Linhagens Geneticamente Padronizadas .....	334
18.3.2.	As mutações .....	335
18.3.3.	O Valor dos Modelos Animais .....	340
18.3.4.	Tabela e Figuras .....	341
18.4.	Bibliografia .....	344
<b>19.</b>	<b>Animais Geneticamente Modificados (Transgênicos) e a Legislação Brasileira de Biossegurança.....</b>	<b>347</b>
19.1.	Introdução.....	347
19.2.	Técnicas de Transgenese .....	348
19.2.1.	Microinjeção de DNA em Pronúcleo .....	349
19.2.2.	Infecção por Retrovírus.....	350
19.2.3.	Células Embrionárias Indiferenciadas (“Embryonic Stem Cells - ES”).....	351
19.2.4.	Espermatozóides como Vetores.....	351
19.2.5.	Biolística.....	352
19.3.	Utilização dos Animais Transgênicos .....	353
19.3.1.	Estudo da Regulação e Expressão Gênica.....	353
19.3.2.	Utilização de Animais Transgênicos como Biorreatores.....	354
19.3.3.	Geração de Modelos Animais para Estudos Biomédicos .....	354
19.3.4.	Introdução de Novas Características Genéticas Importantes Economicamente.....	355
19.4.	Legislação Brasileira de Biossegurança.....	356
19.4.1.	Instrução Normativa Nº 12.....	357
19.4.2.	Instrução Normativa Nº 13.....	366
19.5.	Conclusão.....	368
19.6.	Referências Bibliográficas.....	369

---



## **18. Animais de Laboratório**

**Ana Lúcia Brunialti Godard**

---

### **18.1. SAÚDE DAS ESPÉCIES CONVENCIONAIS DE LABORATÓRIO**

“Saúde é o resultado do equilíbrio entre um ser vivo, seu meio ambiente e os diversos agentes que possam produzir doença”.

O animal de laboratório é o principal elemento na pesquisa. Sua saúde deve ser mantida em condições ideais de modo a permitir reprodutibilidade dos resultados.

Fatores orgânicos e ambientais alteram o funcionamento do organismo do animal e levam a resultados diferentes daqueles que seriam esperados e desejáveis. Estes fatores incluem principalmente as condições sanitárias (higiene), alimentação, água, luz, ruído ambiental etc.

Está amplamente demonstrado que modificações na luminosidade ambiente levam a alteração do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófese, alterando de maneira importante os níveis hormonais. A amônia, o constituinte da urina animal, provoca irritação das vias aéreas e alteração do funcionamento hepático e do sistema nervoso central. O ruído se constitui em fator estressante, modificando as respostas neuro-endócrinas. A falta de higiene proporciona crescimento de bactérias e de parasitas que podem levar o animal a apresentar diarréias e como consequência distúrbios do balanço hidroeletrólítico. Estas são apenas algumas das consequências de condições inadequadas do ambiente onde vive o animal.

Cada experimento tem suas exigências específicas, mas todos eles necessitam que os animais estejam em boas condições de saúde.

A exteriorização do estado de saúde se dá pelo comportamento dos indivíduos de uma colônia quando se encontram isolados ou em grupos.

Conhecer as características de comportamento das diferentes espécies utilizadas é de grande importância para as avaliações diárias das colônias de animais. Em geral as espécies animais apresentam um comportamento social bem definido como o estabelecimento de padrões de hierarquia e atribuições para os diversos membros do grupo. O comportamento anormal dos animais pode ser um reflexo do ambiente inadequado ou mesmo de pessoas envolvidas no trabalho.

Os métodos para se avaliar o estado de saúde dos animais são muitos e vão desde uma análise clínica (inspeção, palpação e auscultação) até os métodos diagnósticos que buscam pela contaminação microbiana ou por parasitas. Entretanto, o melhor dos métodos clínicos, nada mais é que a inspeção, a observação metódica, diária e organizada, dispensando exames aprofundados e dispendiosos. Na tabela 1 são apresentados os principais fatores de interferências nas colônias animais.

**Tabela 18.1** - Fatores que podem interferir no comportamento normal dos animais de laboratório.

FATORES	CONDIÇÕES
Alojamento	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Densidade populacional por gaiola, tipo de gaiola, frequência de trocas, qualidade da limpeza.</li> </ul>
Higiene	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Pessoal: uniformes, banhos, limpeza das mãos.</li> <li>▶ Ambiental: remoção de poeiras e detritos, controle de tráfegos das pessoas, isolamento de áreas de manutenção dos animais.</li> <li>▶ Equipamentos: desinfecção, esterilização, conservação.</li> </ul>
Rações	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Qualidade, quantidade, prazo de validade.</li> <li>▶ Estocagem em ambiente apropriado.</li> </ul>
Animais	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Quarentena, controle sanitário, seleção das matrizes, isolamentos das espécies diferentes.</li> </ul>
Equipe técnica	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Postura, movimentação, manipulação, contenção.</li> <li>▶ Conhecimento das principais características das espécies animais sob seus cuidados.</li> </ul>

**Tabela 18.2** - Correlação entre as condições normais de saúde, os distúrbios do organismo e suas principais causas.

CONDIÇÃO NORMAL	DISTÚRBIOS/SINTOMAS	CAUSAS
<p><b>Pele e Anexos</b></p> <p>Pêlos homogêneos, brilhantes e sedosos com inserção firme. Pele elástica, úmida, lisa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Perda de pêlos;</li> <li>▶ Ferimentos;</li> <li>▶ Formação de cicatrizes ou calos;</li> <li>▶ Irritação da pele;</li> <li>▶ Pêlos sem brilho, perda de pêlos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Fungos, ácaros, sarna, bactérias e eficiência alimentar;</li> <li>▶ Brigas, cama com resíduos grosseiros;</li> <li>▶ Bactérias;</li> <li>▶ Alergias, intoxicação;</li> <li>▶ Anemia, hepatite, distúrbios metabólicos.</li> </ul>
<p><b>Mucosas Aparentes</b></p> <p>Úmidas, brilhantes, róseas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Secas, sem brilho, branca, amarelada etc;</li> <li>▶ Corrimento nasal, ocular (purulento).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Desidratação, anemia, deficiência nutricional, hepatite, infecções, verminoses.</li> </ul>

(continua)

Tabela 18.2 (continuação)

CONDIÇÃO NORMAL	DISTÚRBIOS/SINTOMAS	CAUSAS
<p><b>Olhos</b></p> <p>Brilhantes, úmidos, vivazes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Secos, sem brilho, com corrimento ou purulentos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Desidratação, infecções, conjuntivites, alergias.</li> </ul>
<p><b>Aparelho genital</b></p> <p>Fêmeas com ciclo estral regular (período específico por espécie)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Aborto, infertilidade, canibalismo.</li> <li>▶ Fêmeas roedoras mantidas em gaiola com outras fêmeas, por períodos prolongados, entram em fase de repouso sexual (anestro).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Disfunções hormonais;</li> <li>▶ Deficiência nutricional;</li> <li>▶ Alta densidade de animais por gaiola.</li> </ul>
<p><b>Aparelho digestivo</b></p> <p>Dentes íntegros, número e comprimento. Esôfago, estômago, intestino, fígado, pâncreas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Emagrecimento acentuado.</li> <li>▶ Fraturas de dentes.</li> <li>▶ Apatia, diarreia.</li> <li>▶ Constipações intestinais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Crescimento anormal e quebras de dentes (dificuldade de preensão dos alimentos);</li> <li>▶ Brigas, farpas de alimentos ou outros resíduos;</li> <li>▶ Ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias ou vírus, deteriorados;</li> <li>▶ Desidratação.</li> </ul>

(conclusão)

## 18.2. O CONTROLE SANITÁRIO

Agentes microbiológicos e/ou parasitológicos patogênicos presentes nas colônias de animais de laboratório freqüentemente têm sido responsabilizados por causar: alterações nos resultados experimentais, erro de interpretação do mesmo, morte dos animais das colônias etc.

Atualmente é uma exigência o uso de animais sanitariamente definidos e livres da patógenos específicos para a pesquisa. Devemos ter em mente que como as substâncias químicas altamente puras utilizadas nos laboratórios de pesquisa, os animais de pesquisa são reagentes biológicos e seu padrão de qualidade deve ser sempre uma exigência de quem os utiliza.

Os métodos utilizados para verificar a qualidade sanitária dos animais podem ser de vários tipos:



Monitoração microbiológica: prática de testes repetitivos padronizados, previamente esquematizados e programados para evidenciar a presença de determinadas infecções numa colônia animal.

Checagem esporádica ou ocasional: quando uma infecção é suspeitada testes específicos são realizados visando identificar os patógenos mais prováveis de causar as alterações clínicas e lesões observadas.

Levantamento microbiológico ou "spot test": é realizado para obter informação referente à prevalência de infecções entre animais de laboratório.

Na tabela 16.3 estão descritos alguns dos vírus indicados para monitoração microbiológica em colônias de animais de laboratório.

**Tabela 18.3 - Infecções virais e os órgãos afetados.**

MICROORGANISMO	HOSPEDEIRO	ÓRGÃOS AFETADOS
<b>Adenovírus</b>	▶ M, R, GP.	▶ Sistema respiratório e trato gastrointestinal.
<b>Parvovírus</b>		
▶ Toolans H1.	▶ R.	▶ Sistema nervoso.
▶ Kilham rat vírus.	▶ R.	▶ Sistema nervoso, fígado.
<b>Corona vírus</b>		
▶ Hepatite do camundongo.	▶ M.	▶ Sistema respiratório, trato gastrointestinal, sistema nervoso, fígado e sangue.
▶ Rat corona vírus.	▶ R.	▶ Sistema respiratório.
▶ Rabbit corona vírus.	▶ C.	▶ Trato gastrointestinal e miocárdio.
<b>Paramixovírus</b>		
▶ Sendai.	▶ M, R, H, GP.	▶ Sistema respiratório (M, R).
▶ Simian.	▶ H, GP.	▶ Sistema nervoso (H).
▶ Pneumonia.	▶ M, R, H, GP.	▶ Sistema respiratório (M, R).
<b>Paramixovírus</b>		
▶ Theiler (GDVII, MHG).	▶ M, R.	▶ Sistema nervoso.

Legenda: Camundongos (M), ratos (R), guinea pig (GP), coelhos (C), hamsters (H).

Os agentes microbiológicos, principalmente os vírus, são altamente contagiosos e, portanto, muito prevalentes nas colônias convencionais de animais de laboratório. Uma vez presentes, dificilmente se consegue eliminá-los pelo caráter enzoótico que apresentam. A erradicação da colônia e a descontaminação ambiental com posterior recolonização, adoção de técnicas de manejo eficientes e implantação de sistemas de barreiras de proteção nos biotérios têm sido a conduta mais indicada e utilizada.

Devemos ter em mente que a prevenção é a melhor das condutas quando trabalhamos com animais de laboratório. Nos biotérios convencionais os agentes infecciosos podem ser introduzidos numa colônia e transmitidos de várias maneiras para os animais de laboratório através dos materiais, objetos e equipamentos contaminados que entram nas áreas de criação, por meio de vetores mecânicos ou biológicos (insetos), pela introdução nos biotérios de animais oriundos de colônias contaminadas etc. Já nos biotérios que possuem sistemas de barreiras de proteção, a contaminação pode ser causada por falha técnica que interrompe o sistema de proteção.

No intuito de impedir as contaminações dos animais por agentes patogênicos, podemos tomar algumas medidas preventivas como, por exemplo:

- ▶ implantação de sistemas de barreiras de proteção nos biotérios;
- ▶ treinamento da equipe técnica e dos usuários dos biotérios para a adoção de técnicas de manejo adequadas;
- ▶ implantação de programa de monitorização sanitária permanente;
- ▶ adoção de um programa de rotinas periódicas de desinfecção ambiental e esterilização de todo material que entrará em contato com a colônia;
- ▶ adoção do sistema de quarentena para novas espécies ou linhagens a serem introduzidas no biotério;
- ▶ vigilância permanente para cumprimento de normas técnicas funcionais previamente discutidas e elaboradas.

### **18.3. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS HUMANAS**

Desde a descoberta em 1902 por Garrod que a alcaptonúria (*aku*) era uma desordem do metabolismo de caráter hereditário (*erro inato do metabolismo*), várias outras doenças ou patologias humanas têm sido caracterizadas como uma deficiência genética e, tais descobertas se intensificaram ainda mais com as novas técnicas de biologia molecular.

Paralelamente ao progresso da genética humana, a genética de camundongos ou o estudo de modelos animais de doenças humanas foi criado (**tabela 18.1**). Tais modelos ajudam na compreensão da patogenicidade de várias doenças e, em muitos casos, são usados para testar a eficiência e ausência de efeitos colaterais de uma terapia gênica que busca a compensação ou substituição da função do gene defeituoso no homem.

O objetivo deste artigo é de descrever como os modelos animais das doenças humanas foram descobertos ou induzidos, suas vantagens e limitações.

### 18.3.1. As Linhagens Geneticamente Padronizadas

#### *As linhagens isogênicas*

Os roedores de laboratório suportam relativamente bem um regime de cruzamentos totalmente consanguíneo. Nos ratos e camundongos podemos fazer acasalamentos entre irmãos durante várias gerações obtendo assim populações de animais muito homogêneas do ponto de vista genético. Estas populações são denominadas linhagens isogênicas (*inbred strains*) e elas são muito estáveis e geneticamente padronizadas:

- ▶ elas têm formas alélicas homocigóticas para todos os *loci* do genoma e
- ▶ o conjunto de alelos que compõe o genoma são distribuídos de forma aleatória.

Desta forma, fica claro que toda comparação feita entre camundongos provenientes de linhagens diferentes revelará diferenças genéticas. Para termos acesso a tais diferenças devemos cruzar as diferentes linhagens e analisarmos a transmissão genética de um ou mais caracteres genéticos de uma geração à outra.

Algumas destas linhagens são consideradas como modelos animais para a medicina pois elas desenvolvem doenças como por exemplo a linhagem NOD (Non Obese Diabetic) (Festing M.W., 1996). Nesta linhagem, 80% das fêmeas e 20% dos machos apresentam espontaneamente uma diabetes auto-imune insulino-dependente, análoga à diabetes juvenil do homem.

Por outro lado, as linhagens isogênicas podem apresentar diferenças quanto às reações aos agentes infecciosos. Neste caso observamos que enquanto algumas linhagens são dizimadas pela infecção de um agente patogênico, outras são resistentes. Isto foi observado com os agentes *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* ou pela bactéria *Salmonella* e as Micobactérias (Foote *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1993). Entretanto, neste caso a noção de modelo animal é um pouco mais complicada pois os mecanismos envolvidos no determinismo genético das diferenças de sensibilidade às infecções não são integralmente transponíveis de uma espécie à outra. Para ilustrar esta afirmação podemos utilizar como exemplo o gene *Mx* (para *Myxovirus resistance*, mapeado no cromossomo 16).

A maior parte das linhagens de camundongos de laboratório sucumbe entre 48 e 72 horas após terem sido infectadas pelo vírus da influenza, enquanto que a linhagem A2G resiste a dose 500 vezes mais forte. Esta diferença de sensibilidade é controlada por um único gene, o gene *Mx* que possui dois alelos: o alelo de resistência  $Mx^+$  e o alelo da sensibilidade  $Mx^-$ , o alelo primeiro é dominante sobre segundo. A clonagem e o estudo molecular deste gene serviu para elucidar o mecanismo genético que rege a sensibilidade ou resistência ao *Myxovirus* para todos os mamíferos (Haller *et al.*, 1980).

Nós podemos citar muitos outros modelos conhecidos como, por exemplo, a resistência ao vírus de *Theiler*. Entretanto sabemos que esta é uma área de estudo que só tende a se desenvolver e as estratégias serão cada vez mais generalizadas de um caso para outro. Todas, entretanto buscam o mesmo resultado, que deverá ser o desenvolvimento de vacinas ou de tratamentos para as doenças infecto-contagiosas.

As linhagens isogênicas de camundongos de laboratório derivam todas de um pequeno número de genitores, isto do ponto de vista genético, significa que não existe muita diferença entre os genomas. Por exemplo, todas estas linhagens possuem a mesma molécula de DNA mitocondrial (herdado da mãe) e o mesmo cromossomo Y (herdado do pai). Tal homogeneidade é um fator positivo para o estudo da histocompatibilidade ou estudos sobre a predisposição a algumas formas de câncer. Entretanto o uso destas linhagens não é adequado ao mapeamento genético à alta densidade (indispensável à clonagem posicional), ou do estudo do “imprinting” genético, ou o estudo dos efeitos da epistasia etc. São por estas razões que foram criadas recentemente novas linhagens derivadas de camundongos selvagens capturados na natureza.

Além deste tipo de camundongos, podemos falar das linhagens congênicas, ou das recombinantes (derivadas de duas linhagens isogênicas parentais). Porém, todas estas outras linhagens são produtos de cruzamentos e de seleções a partir das linhagens isogênicas.

### 18.3.2. As mutações

As mutações fazem surgir uma segunda forma alélica permitindo assim a identificação dos genes responsáveis. Todos os seres vivos sofrem mutações no genoma e todas estas mutações são produzidas de forma aleatória tanto nas células somáticas, germinativas, embrionárias e adultas.

Assim que elas são transmitidas às gerações seguintes freqüentemente os seus efeitos são deletérios ou patológicos e podem, neste momento, servirem de modelo para algumas doenças hereditárias humanas ou tornam-se, simplesmente, um utensílio para a ciência.

#### ***As mutações como modelos para doenças humanas***

Nos camundongos e ratos de laboratório existem mais de mil mutações que representam um estoque potencial de modelos animais. Pelos resultados experimentais, nós podemos admitir que a freqüência de mutações espontâneas é próxima de  $5 \times 10^{-6}$  por gameta e por geração para as mutações recessivas e a freqüência em torno de  $2 \times 10^{-7}$  por gameta e por geração para as mutações dominantes. Isto quer dizer que um camundongo entre mais ou menos duzentos possui uma mutação em um locus qualquer.

Entre todas estas mutações que vem sendo coletadas ao longo deste século, algumas reproduzem uma síndrome muito próxima de uma patologia humana. Este é o caso, por exemplo, da mutação alcaptonúria (*aku*) (**Figura 18.1**) a qual mapeamos sobre o cromossomo 16 dos camundongos (Montagutelli *et al.*, 1994). O mesmo gene (o do ácido homogentísico) é afetado no homem e no camundongo e os sintomas são muito parecidos nestas duas espécies (a urina torna-se escura oxidando-se após o contato com ar). Muitas outras mutações como esta já foram descritas, mas acontece que os sintomas de uma mesma doença podem ser mais severos de uma espécie a outra. A distrofia muscular de Duchenne, da qual conhecemos um modelo animal que é o camundongo *mdx*, é a consequência de uma mutação em um enorme gene de estrutura mapeado sobre o cromossomo X. Tal mutação interrompe a produção de uma proteína essencial na miogênese: a distrofina. No homem, os efeitos desta mutação são severos enquanto que nos camundongos são quase imperceptíveis. Este modelo é interessante pois no dia em que os geneticistas descobrirem a razão desta diferença de fenótipo entre estas duas espécies contendo a mesma mutação nós teremos progredido muita na compreensão desta terrível doença e talvez estejamos caminhando para a cura da mesma.

Mesmo sendo abundantes, as mutações de camundongos e de ratos susceptíveis de serem modelos para os geneticistas humanos ainda são insuficientes. Nós conhecemos, por exemplo, oito mutações de camundongos cujos efeitos afetam a sobrevivência dos motoneurônios na medula espinhal, porém nenhuma destas mutações serve como modelo animal de uma neuropatia humana pois em nenhum dos casos, as localizações genéticas coincidem com o mapeamento genético humano. Este é o caso, por exemplo, da mutação “progressive motor neuronopathy” (*pmn*) (**Figura 18.2**) com a qual trabalhamos, há algum tempo, tentando clonar o gene responsável. Durante um certo tempo ela foi considerada como sendo o modelo animal da Amiotrofia espinhal humana (SMA para Spinal Muscular Atrophy) do tipo I, a mais severa. Mapeamos esta mutação na região centromérica do cromossomo 13 de camundongos (Brunialti *et al.*, 1995), longe da região cromossômica homóloga ao cromossomo 5 local onde foi mapeado a doença humana. Tal descoberta serviu para descartar este camundongo como sendo um modelo animal para síndrome humana.

Esta constatação indica, por outro lado, que é indispensável coletarmos e mesmo produzirmos em massa novas mutações para suprir esta deficiência. Estatísticas feitas no Jackson Laboratory (a “Meca” da genética de camundongos) nos Estados Unidos e no nosso laboratório no Instituto Pasteur de Paris indica que, em torno de 60% de novas mutações espontâneas ou induzidas, identificam um gene novo e não uma nova forma alélica de um gene já conhecido. Podemos deduzir então, que o genoma de camundongos está longe de estar saturado de mutações sendo, desta forma, uma fonte riquíssima para o estudo de modelos animais para as doenças humanas.

Podemos aumentar o número de mutações nos camundongos através da utilização de agentes mutagênicos químicos ou físicos. Os mutagênicos químicos são mais cômodos de que os físicos, pois são mais baratos e fáceis de serem utilizados. Entre eles o mais conhecido e também o mais eficaz são o etil-nitroso-uréia (ENU) (Brown S.D.M. *et al.*, 1998). Uma única dose de 250mg/Kg do peso corporal, administrada via intraperitoneal, aumenta em até 102 vezes a frequência de mutações observadas. Com tal agente mutagênico podemos produzir um grande número de alelos mutantes do mesmo *locus*, e assim, estudarmos os diferentes domínios de uma mesma proteína. Nós podemos igualmente submeter uma população de camundongos a uma forte pressão mutagênica para procurar, na descendência, alguns fenótipos que podem ser interessantes para uma dada patologia. Este tipo de experiência foi realizado pela primeira vez por Vernon C. Bode e colaboradores (1988) quando descobriram o modelo animal da fenilcetonúria humana (Figura 3). Tal experimento foi renovado pelos pesquisadores Alexandra Shedlovsky e J. David McDonald (1990) que publicaram uma lista exaustiva de mutações pontuais induzidas nos camundongos no gene da fenilalanina hidroxilase (*Pah*) para servir de modelo à síndrome humana da fenilcetonúria (PKU). Este modo de utilização da mutagênese é muito interessante pois ela demonstra o valor dos modelos animais na análise dos diferentes aspectos de uma síndrome humana. Ela também mostra que é possível induzir novas mutações num mesmo locus ou em outros para proceder ao inventário de todos os caminhos implicados em uma doença metabólica, este é o caso da fenilcetonúria da qual pudemos conhecer todas as vias do metabolismo através deste procedimento. Poderíamos citar mais exemplos aonde a mutagênese foi utilizada na identificação de novas mutações que afetem um tecido ou uma função em particular. Podemos citar o exemplo de Jack Favor e colaboradores em Munique que isolaram mais de 75 mutações todas afetando o cristalino dos camundongos para provocar catarata. Ou então, o que foi feito pela equipe do Dr. Steve Brown na Inglaterra, aonde uma experiência do mesmo tipo que a anterior foi realizada para saturar o genoma de camundongos com mutações que levam a surdez a fim de identificar os genes que estão implicados no desenvolvimento do ouvido interno.

### ***As mutações como instrumentos para a pesquisa***

Como já foi mencionadas anteriormente as mutações permitem de identificar um gene através de um fenótipo patológico ou anormal. Isto quer dizer que é possível clonar um gene identificado unicamente por um alelo mutado do qual o fenótipo é, *a priori*, interessante e isolar um gene cuja função é importante. Este foi o caso de Jeffrey Friedman e colaboradores que clonaram os genes responsáveis pela diabetes (*db*) e pela obesidade (*ob*) (Zhang *et al.*, 1994) (**Figura 18.4**) nos camundongos e que eram conhecidos unicamente pelos seus fenótipos anormais. Utilizando os camundongos exatamente como os geneticistas dos vegetais fizeram com *Arabidopsis thaliana*, como uma fonte de genes a serem clonados, a equipe de Friedman identificou a proteína chamada leptina que está envolvida na regulação do metabolismo dos lipídeos e no controle da satisfação alimentar. Este é um dos muitos exemplos que poderíamos citar da identificação e clonagem de um gene unicamente através do seu fenótipo patológico.

### ***As mutações produzidas *in vitro* pela recombinação homóloga nas células embrionárias***

O antigo sonho dos geneticistas de poderem provocar mutações dentro de um gene escolhido, *a priori*, foi realizado em decorrência dos trabalhos realizados por Capecchi e colaboradores (1989), estes conseguiram substituir *in vitro*, ou seja, dentro das células embrionárias em cultura, uma seqüência de DNA normal por uma seqüência homóloga mutada. Esta técnica, chamada de “gene knock-out” permite, em teoria, de inativar qualquer gene desde que sua seqüência genômica seja conhecida. Tecnicamente podemos inativar de maneira sistemática todos os genes dos quais a seqüência seja conhecida mas não a sua função para podermos conhecer seus efeitos sobre o embrião e/ou o adulto. Através deste método já foi produzido muitos modelos animais de doenças humanas. Este é o caso das doenças de Tay Sachs, Werdnig Hoffmann (Amiotrofia Espinal de Tipo I) e de muitas outras que já possuem um modelo animal obtido pelo “knock-out” (Sango *et al.*, 1995). Até o presente momento esta técnica é usada unicamente nos camundongos pois só nesta espécie é que existe as células E.S. (Embryonic Stem cells) e, na maior parte do tempo, elas só não permitem a produção de um alelo nulo de um determinado gene. Atualmente novas técnicas de inativação de genes têm aparecido. Podemos citar o método denominado *cre-loxP* (Gu *et al.*, 1994) com o qual podemos inativar um gene de forma específica em um tecido determinado com um tempo pré-estabelecido. Nós podemos chamá-lo de inativação premeditada espaço-temporal. Esta técnica é a única que possibilita a inativação de genes essenciais durante o desenvolvimento embrionário, porém ela perde sua especificidade tissular no indivíduo adulto.

### ***A transgênese***

Com o desenvolvimento muito rápido da engenharia genética, nós podemos hoje em dia, acrescentar um gene clonado ou um fragmento de DNA ao patrimônio genético de um animal de laboratório (Palmiter *et al.*, 1982). Desta forma criamos um animal transgênico que adquiriu de forma estável uma informação genética a qual não veio pelos canais naturais da evolução. Esta “manipulação” do genoma representa o avanço mais importante da genética moderna.

Este método, ao contrário do anterior, pode ser aplicado a todas as espécies que possuam DNAs clonados. A técnica consiste em injetar diretamente um fragmento de DNA clonado e linear, dentro de um dos pronúcleos com a ajuda de uma micro-pipeta. A integração do transgene se faz, provavelmente, de forma aleatória e, quase sempre, durante a primeira divisão mitótica do ovócito. Desta forma todas as células portam o

transgene no genoma. As vezes a integração não é homogênea e o animal que resulta é chamado de quimera, pela justa posição de células transgênicas e normais.

A transgênese permite o acréscimo de um gene suplementar no genoma, sendo assim, podemos dizer que é uma genética de adição opondo-se à genética tradicional que é de substituição de alelos. Pela transgênese nós podemos aumentar o número de cópias de um gene qualquer e verificar se esta modificação da dosagem tem efeitos ou não. Podemos também modificar a estrutura do transgênico e mudar, por exemplo, as seqüências reguladoras que estão, na maior parte do tempo, situadas nas extremidades 5' das seqüências codificadoras. Assim nós podemos fazer com que o transgene seja expresso em um estado do desenvolvimento diferente do estado normal ou que ele seja expresso em um tecido diferente. Ao combinarmos todas estas possibilidades pudemos obter vários modelos animais de doenças humanas. Talvez um dos mais interessantes tenha sido o que foi feito pela equipe do Dr. Hiromichi Yonekawa que mostrou que, ao se produzir um camundongo transgênico para o gene humano que codifica para o receptor do vírus da poliomielite, eles o tornaram sensível à infecção viral.

A mesma coisa foi feita para o vírus da hepatite C. Podemos dizer que tais trabalhos são muito importantes na pesquisa sobre estas duas doenças pois agora dispomos de modelos animais. Porém, ela causa ao mesmo tempo um problema de biossegurança gerando novas espécies de animais sensíveis às infecções, em outras palavras, ela produziu um reservatório potencial de vírus.

Vários camundongos transgênicos para os receptores do vírus da AIDS foram construídos mas, até agora, ainda não dispomos de um modelo animal. O grande problema está em termos toda a estrutura que permita ao vírus de se replicar e de se encapsular de novo.

Também podemos falar de animais transgênicos resultantes da regulação anormal de um gene. Talvez o melhor exemplo ainda seja, o do animal que tem uma super produção do hormônio de crescimento humano (HGH). O resultado deste trabalho foi a produção de animais muito maiores que os normais e com uma série de patologias menores.

Vários outros modelos foram obtidos pela interrupção do controle da expressão de um gene. Este é o caso dos transgênicos construídos à partir das seqüências codificadoras das células oncogênicas regulados por promotores não específicos. Tais animais desenvolvem um número elevado e freqüente de neoplasias, mas quando, ao contrário, o promotor é histo-específico, o câncer ocorre em tecidos específicos.

A produção de animais transgênicos talvez seja o melhor caminho para estudar os mecanismos da oncogênese pois ela não requer uma translocação cromossômica recíproca para ativar o gene oncogênico em questão. O melhor exemplo para a afirmação anterior é o modelo animal da leucemia aguda humana que foi obtido pela construção artificial do chamado cromossomo Filadélfia humano (no homem é a translocação recíproca 9q34-22q11 e nos camundongos é a junção do 1º exon em 5' do gene bcr aos exons em 3' do gene c-Abelson). Infelizmente estes animais não ajudaram na elucidação da relação de causa e efeito que existe entre a presença do cromossomo Filadélfia e o desenvolvimento de uma leucemia aguda pois tais animais morrem ainda pequenos.

### ***Modelos transgênicos resultantes da introdução de grandes fragmentos de DNA nas células germinais de camundongos***

Várias equipes de pesquisadores têm obtido sucesso na produção de animais transgênicos com a transferência de grandes fragmentos de DNA clonados em Yeast Artificial Chromosome (YAC) ou Bacterial Artificial Chromosome (BAC) dentro das células germinais (Jacobovits et al., 1993) ou, simplesmente, através da injeção no pronúcleo do DNA de YAC purificado. Tais transgênicos são utilizados no estudo da compreensão dos efeitos de uma doença da qual não conhecemos exatamente o gene responsável mas temos a região cromossômica aonde ele foi mapeado.

Como exemplo, podemos citar o animal transgênico chamado “olhos pequenos” (Sey/+), este carrega no seu genoma um YAC de 420 Kb que possui o gene humano PAX6. Durante este experimento foi observado que os animais portadores deste YAC vinham super exprimindo o gene PAX6, consequência da integração múltipla deste gene, e que apresentavam uma desorganização nos olhos microfotômicos. Tal resultado mostrou a importância que tem o nível de expressão do gene PAX6 para este órgão.

Dois outros modelos animais de doenças humanas também foram conseguidos usando-se os YACs para as doenças de Charcot-Marie-Tooth e a Síndrome de Down.

Charcot-Marie-Tooth tipo I é uma doença hereditária autossômica dominante que é o resultado da duplicação de uma região que contém o gene PMP22 (proteína mielínica periférica-22). O YAC humano contendo, entre outras seqüências de DNA, 40 Kb do gene PMP22 humano foi introduzido nas células germinais de camundongos. O resultado foi a produção de animais que sofrem de uma dimielinização periférica similar, porém mais severa, que a da doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo I.

A Síndrome de Down ou o mongolismo é uma doença humana causada pela trissomia do cromossomo 21 e ela está associada a um certo número de defeitos e anomalias muito bem caracterizadas. Nós podemos dizer que tais defeitos são mais ou menos uma consequência direta das expressões anormais de uma série de genes localizados sobre o cromossomo 21 sendo a região 21q22.2 a mais crítica. Para tentar entender melhor e também poder definir um ou mais genes responsáveis por esta Síndrome, Smith e colaboradores (1997) construíram vários animais transgênicos cada um carregando um YAC diferente contendo 2 Mb da totalidade da região 21q22.2. Os camundongos que possuíam dois YACs diferentes e que não se sobrepunham no mapa físico da região, apresentaram dificuldades de aprendizado indicando que ao menos dois genes contidos nesta região cromossômica são responsáveis por este problema quando presentes em mais do que duas cópias. Um destes dois genes foi identificado: é o gene homólogo ao gene dito “mini-cérebro” de *Drosófila*, responsável pelos defeitos na aprendizagem das moscas.

Não temos dúvida alguma que a tecnologia de transferência de fragmentos de DNA de vários tamanhos (pequenos, grandes ou extragrandes) para o genoma de camundongos (transgênese) terá um grande impacto na gênese de modelos animais de doenças humanas. Entretanto ela tem seus limites. Um deles é que ela funciona pela adição de uma seqüência exógena e não pela substituição de uma informação no genoma. Isto significa que não é possível produzir uma alteração recessiva, exceto nos raros casos onde ocorre interrupção acidental da uma seqüência codificadora.



### 18.3.3. O Valor dos Modelos Animais

Várias vezes nós destacamos que os fenótipos patológicos dos modelos animais são, na maior parte do tempo, diferentes aos das doenças humanas. Geralmente a mesma mutação no camundongo e no homem provoca uma patologia mais severa neste último. Às vezes as diferenças são extremas como, por exemplo, no caso da falta da proteína distrofina nos camundongos que quase não tem efeito algum enquanto que no homem é a causa da distrofia muscular de Duchenne. A mutação no gene hypoxantine fosforil transferase (HPRT) não tem efeito algum nos camundongos, enquanto que a mesma causa uma doença terrível chamada Lesch-Nyhan caracterizada por um retardamento mental no homem.

Na realidade, quando analisamos esta situação nós não deveríamos estar surpresos com o resultado pois, a priori, nós não temos razão alguma de considerarmos o camundongo ou o rato como um homem em miniatura. Robert Erickson (1989) propõem três possíveis explicações para estas diferenças: existem (i) variações nas vias bioquímicas do metabolismo entre o camundongo e o homem, (ii) variações no desenvolvimento e (iii) a relação entre tempo absoluto e tempo fisiológico no desenvolvimento de uma doença não é a mesma entre o homem e o animal. Para justificar a primeira hipótese podemos retomar o caso já falado acima do modelo animal da Síndrome de Lesch-Nyhan humana. Quanto às diferenças no desenvolvimento, podemos falar da deficiência em anidrase carbônica (CAII) que no homem causa osteoporose, calcificações intracraniana e retardamento mental, enquanto que a mesma deficiência nos camundongos não tem efeito patológico algum.

Enfim, as pesquisas sobre os metabolismos tóxicos são difíceis de serem realizadas com modelos animais pois são baseadas na acumulação dos agentes tóxicos ao longo do tempo de vida do indivíduo, assim fica evidente que os resultados patológicos encontrados nos animais, se houverem, não serão os mesmos que os encontrados no homem.

Os modelos animais por mais úteis e numerosos que sejam têm seus limites. Entretanto eles são indispensáveis no estudo das doenças genéticas humanas pois permitem, por exemplo, o estudo da patologia de uma síndrome ao longo do tempo, no desenvolvimento de terapias gênicas, na descoberta de novos genes que podem ser uma fonte para novos medicamentos (por exemplo a descoberta do gene obese de camundongos que codifica para a leptina. Esta proteína é usada atualmente no tratamento de um tipo de obesidade humana) ou nos genes modificadores que têm papéis determinantes na gravidade de um fenótipo e que constituem novos alvos para tratamentos. Ao combinarmos as diferentes técnicas que estão disponíveis hoje em dia para a modificação do genoma dos animais de laboratório, os geneticistas poderão em breve obter modelos que sejam mais fidedignos às doenças humanas. Podemos acabar dizendo que a experimentação animal, a partir de agora, mudou radicalmente.

### 18.3.4. Tabela e Figuras

A tabela abaixo mostra os sítios da internet mais interessantes sobre a genética de camundongos e os modelos animais.

**Tabela 18.4 - Fontes de informações dos modelos animais**

SÍTIOS	INTERESSE	ENDEREÇOS
<b>Informações Gerais</b>		
▶ Pub Méd.	+++	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/</a>
▶ Search OMIM.	+++	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omn/searchomim.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omn/searchomim.html</a>
▶ The Jackson Labotatory.	+++	<a href="http://www.jax.org/">http://www.jax.org/</a>
▶ Mouse and Rat Research Home Page.	+++	<a href="http://www.cco.caltech.edu:80/~mercer/htmls/rodent_page.html">http://www.cco.caltech.edu:80/~mercer/htmls/rodent_page.html</a>
▶ MGI - Genes, Marcadores e Fenótipos.	+++	<a href="http://www.informatics.jax.org/locus.html">http://www.informatics.jax.org/locus.html</a>
▶ Internet Resources for Transgenic and Targeted Muation Research.	+++	<a href="http://brut.gdb.org/Dan/tbase/docs/databases.html">http://brut.gdb.org/Dan/tbase/docs/databases.html</a>
<b>Informações de todas as espécies animais</b>		
▶ OMIA.	+++	<a href="http://www.angis.su.oz.au/Databases/BIRX/omia/">http://www.angis.su.oz.au/Databases/BIRX/omia/</a>
<b>Genética</b>		
▶ Camundongo.	+++	<a href="http://www.informatics.jax.org/locus.html">http://www.informatics.jax.org/locus.html</a>
<b>Criação de Modelos</b>		
▶ MRC Mammalian Genetics Unit - ENU UK - Programa de Mutagênese nos camundongos.	+++	<a href="http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/">http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/</a>
▶ The Institute of Mammalian Genetics - R. Balling - Programa de Mutagênese nos camundongos.	+++	<a href="http://www.gsf.de/isg/">http://www.gsf.de/isg/</a>
▶ Lexicon Genetics, Inc - Produção de modelos por encomenda.	+++	<a href="http://www.lexgen.com/">http://www.lexgen.com/</a>
<b>Disponibilidade de Modelos</b>		
▶ ILAR Home.	+++	<a href="http://www2.nas.edu/ilarhome/">http://www2.nas.edu/ilarhome/</a>
▶ The Jackson Laboratory – Resources.	+++	<a href="http://www.jax.org/resources/documents/">http://www.jax.org/resources/documents/</a>

**Figura 18.1** - Mutação alcaptonúria (aku)

A urina dos animais doentes torna-se escura após o contato com o ar o que a oxidação. Na foto o animal afetado está à esquerda e na direita o normal



**Figura 18.2** - Mutação pmn

A fraqueza muscular dos animais pmn (à direita na foto) se caracteriza pela incapacidade de esticar as patas posteriores quando erguemos os camundongos pelo rabo.



**Figura 18.3 - Mutação fenilcetonúria**

Os camundongos pertencem a mesma linhagem (BTRB). A despigmentação vista no animal de cor marrom é um componente da síndrome da fenilcetonúria.



**Figura 18.4 - Mutação obeso (ob)**

A massa corporal do animal obeso (à esquerda na foto) é muito maior que a do animal normal (à direita na foto)



## 18.4. BIBLIOGRAFIA

- ▶ BODE, V. C.; MCDONALD, J. D.; GUÉNET, J. L. & SIMON, D. **A mouse mutant with hereditary hyperphenylalaninemia induced by ethyl-nitroso-urea mutagenesis.** Genetics 118: 299-305. 1988.
- ▶ BROWN, S. D. M. & NOLAN, P. M. **Mouse mutagenesis - systematic studies of mammalian gene function.** Human Molecular Genetics: 1627-1633. 1988.
- ▶ BRUNIALTI, A. L. B.; POIRIER, Schmalbruch H. & GUÉNET, J. **The mouse mutation Progressive Motor Neuronopathy (pmn) maps to chromosome 13.** Genomics, 29:131-135. 1995.
- ▶ COHEN-TANNOUJJI, M. & BABINET, C. **Beyond “knock-out” mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome.** Mol. Hum. Reproduction 4 (10): 929-938. 1998.
- ▶ DE LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B. & NEVES, S. **Manual para técnicos em bioterismo.** 2ª edição, COBEA. 1996.
- ▶ ERICKSON, R. P. **Why isn't a mouse more like a man?** Trends Genet. 5: 1-3. 1989.
- ▶ FESTING, M. W. **Origins and characteristics of inbred strains of mice,** In: LYON, M. F.; RASTAN, S. & BROWN, S. D. M.; (Eds), Genetics Variants and Strains of the Laboratory Mouse, Oxford University Press: 1537-1576. 1996.
- ▶ FOOTE, S. J.; BURT, R. A.; BALDWIN, T. M.; PRESENTE, A.; ROBERTS, A. W.; LAURAL, Y. L.; LEW, A. M. & MARSHALL, V. M. **Mouse loci for malaria-induced mortality and control of parasitaemia.** Nature Genet. 17: 380-381. 1997.
- ▶ GU, H.; MARTH, J. D. & ORBAN, P. C. **Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting.** Science 265: 103-106. 1994.
- ▶ HALLER, O.; ARNHEITER, H.; LINDENMANN, J. & GRESSER, I. **Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus.** Nature 283: 660-662. 1980.
- ▶ JACABOVITS, A.; MOORE, A. L. & VREGARA, G. J. **Germeline transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome.** Nature 362: 255-258. 1993.
- ▶ MCDONALD, J. D.; BODE, V. C.; DOVE, W. F. & SHEDLOVSKY, A. **Pah<sup>hph-5</sup>: a mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1965-1967. 1990.
- ▶ MONTAGUTELLI, X.; LALLOUETTE, A.; COUDÉ, M.; KAMOUN, P.; FOREST, M. & GUÉNET, J. L. **Aku, a mutation of the mouse homologous to human alkaptonuria, maps to chromosome 16.** Genomics 19: 9-11. 1994.
- ▶ PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. & HAMMER, R. E. **Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes.** Nature 300: 611-615. 1982.
- ▶ SAIZ, L. M.; GARCIA DE OSMA, J. L. & COMPAIRE, C. F. **Animales de laboratorio: producción, manejo y control sanitario.** Madrid: INIA, 233-7. 1983.

- ▶ SANGO, K.; YAMANAKA, S.; HOFFMANN, A.; OKUDA, Y.; GRINBERG, A.; WESTPHAL, H. & MACDONALD, M. P. **Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism.** Nature Genet. 11: 170-176. 1995.
- ▶ SMITH, D. J. & STEVENS, M. E. **Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down Syndrome.** Nature Genet. 16: 28-36. 1997.
- ▶ VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E. & GROS, P. **Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg.** Cell 73: 469-485. 1993.
- ▶ WAGGIE, K.; KAGIYAMA, N.; MALLEEN, A. & NOMURA, A. **Manual of mycrobologic monitoring of laboratory animals.** 2 ed. Bethesda: National Institute of Health Publication, 1-109. 1994.
- ▶ ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. **Posicional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** Nature 372: 425-432. 1994.



## **19. Animais Geneticamente Modificados (Transgênicos) e a Legislação Brasileira de Biossegurança**

**Luciana de Andréa Ribeiro**

**Vasco Azevedo**

---

### **19.1. INTRODUÇÃO**

Durante séculos, produtores rurais vem praticando seleção artificial em várias raças e linhagens de animais domésticos, objetivando aumentar a frequência de genes que permitam a expressão de características economicamente relevantes. No entanto, quando o objetivo é a obtenção de mudanças mais drásticas no potencial genético, como mudança da base alimentar (pasto x grãos) ou nos requerimentos de mercado (redução de gordura), os produtores têm lançado mão de estratégias de substituição de raças ou cruzamentos, transferindo genes de uma população para outra, dentro de uma mesma espécie (Cundiff *et al.*, 1993). Na década passada, foram desenvolvidas técnicas para transferir genes específicos, com efeitos desejáveis, não somente de uma raça para outra, mas de uma espécie para outra (Pursel & Rexroad, 1993).

O desenvolvimento de técnicas de introdução de genes em células somáticas e germinativas de animais domésticos e de laboratório foi um dos principais avanços tecnológicos ocorridos nas últimas duas décadas. Animais geneticamente manipulados têm fornecido novos modelos de estudos da regulação gênica, da ação de oncogenes e das interações celulares envolvidas no sistema imune. Além disto, a tecnologia de transgênese animal possibilita a geração de modelos animais precisos para estudo de doenças genéticas humanas e a produção, em larga escala, de proteínas recombinantes de interesse farmacológico humano (Jaenisch, 1988; Pursel & Rexroad, 1993 e Wall, 1996). Duas outras utilizações de animais transgênicos, para um futuro próximo, é a produção de animais transgênicos (freqüentemente suínos), que sejam imunes à rejeição, servindo como doadores de órgãos para transplante em humanos (xenotransplante) (Lanza *et al.*, 1997) e para a produção de alimentos, esta última permanece pouco explorada. Isto decorre devido ao reduzido número de genes de interesse para a agropecuária que já tenham sido identificados, isolados, seqüenciados e clonados (Pursel & Rexroad, 1993).

Animais transgênicos podem ser definidos como aqueles que contém moléculas de DNA exógeno, introduzidas por intervenção humana intencional, objetivando a expressão de novas características (Wall, 1996). Por analogia, o gene transferido denomina-se transgene (Pursel & Rexroad, 1993). Entretanto, a integração por si só não garante a expressão do transgene, e, uma outra definição seria, aquele animal que expressa o transgene e que quando acasalado com animais normais, produz progênies que herdarão este gene de forma mendeliana, devido a incorporação do transgene nas células germinativas (Gordon & Ruddle, 1981).



O primeiro experimento com transgênese animal foi realizado com células da linhagem germinativa de camundongos em 1974. O genoma inteiro do vírus Simian foi microinjetado na cavidade blastocélica de embriões em estágio inicial do desenvolvimento (Jaenisch & Mintz, 1974). Entretanto, a integração de DNA viral só foi detectada, em estudos subsequentes, quando embriões de camundongos foram microinjetados com o retrovírus da leucemia de Moloney, gerando a primeira linhagem de camundongos transgênicos (Jaenisch, 1977). A partir dessa data, vários protocolos tem sido desenvolvidos, buscando-se alterar o genótipo de animais de maneira estável.

A expressão do DNA exógeno, por sua vez, foi obtida também em camundongos, no início da década de 80 (Gordon & Ruddle, 1981; Palmiter *et al.*, 1982, 1983). Camundongos gigantes, gerados a partir da introdução do transgene (gene do hormônio do crescimento humano sob o controle do promotor do gene da metalotioneína de camundongos) em embriões de uma única célula, demonstraram que a integração foi estável e a expressão foi correta nos tecidos do animal adulto (Palmiter *et al.*, 1983). Estes resultados incentivaram a aplicação das técnicas de transgênese, visando aumentar a taxa de crescimento em animais domésticos. Coelhos, ovelhas e porcos transgênicos foram obtidos, em meados da década de 80 (Hammer *et al.*, 1985) e bovinos e caprinos, no início dos anos 90 (Pursel & Rexroad, 1993). Entretanto, a eficiência de transformação obtida foi menor do que em camundongos.

## 19.2. TÉCNICAS DE TRANSGENESE

Várias técnicas têm sido utilizadas para a introdução de genes em células germinativas e em células somáticas, de várias espécies animais. Para a produção de animais domésticos transgênicos as técnicas mais utilizadas são:

- ▶ microinjeção de DNA em pronúcleo;
- ▶ infecção por retrovírus;
- ▶ células embrionárias indiferenciadas (“embryonic stem cells”);
- ▶ espermatozóides como vetores;
- ▶ biolística.

Dependendo da técnica utilizada, o animal produzido pode constituir-se somente de células que carregam o transgene (são os denominados animais transgênicos), ou de conjuntos de células com ou sem o transgene (animais quiméricos ou mosaicos). Os animais quiméricos são constituídos de células de origens distintas, enquanto que, os mosaicos são constituídos de células derivadas de um único blastocisto original. As técnicas que envolvem a introdução de células transformadas em um embrião receptor (por exemplo, a transfecção de células embrionárias indiferenciadas e, posterior, introdução destas células em embriões em estágio de blastocisto) darão origem a animais quiméricos. Por outro lado, técnicas que transfectam diretamente as células do animal a ser transformado, produzirão animais mosaicos. Nas duas situações, os animais transgênicos só serão obtidos, após o cruzamento de indivíduos heterozigotos F1 com animais normais (Notarianni & Evans, 1992).

### 19.2.1. Microinjeção de DNA em Pronúcleo

Esta técnica consiste na microinjeção de genes, diretamente, no pronúcleo de um ovo recém fertilizado (Gordon *et al.*, 1980). Geralmente, múltiplas moléculas de DNA em tandem integram-se estavelmente no genoma do hospedeiro, em um único sítio de inserção (Jaenisch, 1988). Entretanto, nem sempre isto ocorre, por exemplo, Lacey *et al.* (1986) observaram que o vírus do papiloma de bovinos ou integrava-se, estavelmente, ao genoma de camundongos transgênicos ou mantinha-se como um epissomo, dependendo da estrutura do DNA injetado.

A maior vantagem deste procedimento é a eficiência em gerar linhas transgênicas que expressem o transgene de maneira correta. Entretanto, esta técnica é limitada, não podendo ser utilizada em embriões, em estágio mais avançado do desenvolvimento (Gordon, 1989). Outras limitações desta técnica são: rearranjos causados no genoma da célula microinjetada e introdução de várias cópias do transgene, originando animais com expressão variável do transgene (Gordon & Ruddle, 1981; Mahon *et al.*, 1988). Em animais domésticos, a proporção de indivíduos transgênicos, que se desenvolveram a partir de um ovo microinjetado, é menor do que aquela observada em camundongos. Isto ocorre devido a alguns fatores, tais como: difícil visualização dos pronúcleos, disponibilidade de ovos recém fertilizados, sincronismo dos animais receptores e doadores, idade do animal doador e número de ovos transferidos, entre outros (Martin & Pinkert, 1994).

A porcentagem de embriões injetados que desenvolveram-se em animais transgênicos varia de 1 a 3% em caprinos (Gavin, 1997), 0,3 a 4,0% em suínos (Pursel, 1997); 0,1 a 4,4% em ovinos e 0,7 a 3,2% em bovinos (Gagné *et al.*, 1997).

Em aves, a microinjeção diretamente no pronúcleo não é utilizada, pois os pronúcleos feminino e masculino são mascarados pelo citoplasma opaco e, também, é difícil distinguir o pronúcleo masculino, que irá contribuir para a formação do zigoto, devido a presença de pronúcleos masculinos supranumerários. Não sendo possível injetar DNA, dentro do pronúcleo, injeta-se, então, no citoplasma próximo aos pronúcleos (Ginsburg & Eyal-Giladi, 1987). A expressão de DNA exógeno, injetado no citoplasma de ovos fecundados, foi verificada por Naito *et al.* (1991) e Sang & Perry (1989). Os genes injetados mostraram-se, todavia, epissomais e perderam-se, gradativamente. A produção de galinhas transgênicas, por microinjeção de DNA, no disco germinal de zigotos e posterior cultura, *ex vivo*, do embrião até a eclosão, foi obtida, logo a seguir, por Love *et al.* (1994) e Naito *et al.* (1994). Estes trabalhos demonstraram transmissão estável do DNA exógeno para a progênie, mas com baixa eficiência (menos de 1% dos embriões injetados apresentaram o DNA exógeno).

Para aumentar a taxa de transgenese em espécies superiores, muitas técnicas tem sido desenvolvidas visando melhorar a integração dos transgenes, tais como: bombardeamento de partículas (Ribeiro *et al.*, 1999; Zelenin *et al.*, 1997), inserção por retrovirus (Kim *et al.*, 1993), espermatozoides como vetores (Gagné *et al.*, 1991) e células embrionárias indiferenciadas (Cherny *et al.*, 1994). Cada técnica tem suas vantagens em comparação com a microinjeção pronuclear, no entanto, nenhum método tem demonstrado sua habilidade em produzir bovinos transgênicos (Menck *et al.* 1998).

### 19.2.2. Infecção por Retrovírus

Genes exógenos podem ser inseridos no genoma de retrovírus e, estes podem ser, então, utilizados como vetores de DNA. Ao contrário da técnica de microinjeção de DNA em pronúcleos, os retrovírus integram o gene exógeno, por um mecanismo precisamente definido, no genoma da célula hospedeira. Somente uma cópia do vírus é inserida em determinado sítio do cromossomo e nenhum rearranjo no genoma é induzido, exceto para uma pequena duplicação de uma seqüência do genoma no sítio de integração (Jaenisch, 1988; Menck, 1998). A infecção por retrovírus pode ocorrer por exposição das células a alta concentração do vírus, por co-cultura em monocamada de células infectadas com o retrovírus ou, no caso de aves, pela microinjeção do retrovírus diretamente no blastodisco (Pursel & Rexroad, 1993).

A principal vantagem do uso de vetores retrovirais, para transferir genes em animais, é a facilidade de se introduzirem vírus em embriões em vários estádios do desenvolvimento. No entanto, o tamanho do DNA a ser introduzido é limitado (menos de 6 Kb) e, geralmente, pode apresentar problemas de expressão do gene, devido à alta instabilidade de tais vetores. Outras desvantagens desta técnica são: difícil manipulação dos retrovírus; o animal resultante é um mosaico, sendo necessários, portanto, cruzamentos, para a obtenção de uma linhagem transgênica pura e a eficiência de transformação das células germinativas é baixa (Jaenisch, 1988; Pursel & Rexroad, 1993).

Em aves, a transferência de genes para linhagens germinativas tem sido obtida por infecção de retrovírus replicação-defectiva ou replicação-competente em embriões, logo após a postura dos ovos (Bosselman *et al.*, 1989; Briskin *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 1986; Salter & Crittenden, 1989; Salter *et al.*, 1987, 1993 e Shuman & Shoffner, 1986), em óvulos não fecundados (Shuman & Shoffner, 1986) ou em células germinativas primordiais (Vick *et al.*, 1993). Embora tais vetores retrovirais sejam apontados como a melhor técnica para a produção de galinhas transgênicas, ocorrem algumas desvantagens. Primeira: a proporção de embriões, oriundos de ovos infectados com vírus, que transmitem o DNA exógeno para as suas progênes é relativamente baixa. Segunda: centenas ou milhares de ovos devem ser inoculados e um número similar de progênes deve ser examinado, quanto à presença do transgene, para identificar uma galinha transgênica. Terceira: vírus replicação-competente provocam viremia crônica, enquanto que vírus replicação-deficiente são difíceis de se propagarem eficientemente. Quarta: o tamanho do gene a ser introduzido, no vetor retroviral, é limitado para cerca de 2 kb para vírus replicação-competente e cerca de 6 kb para vírus replicação-deficiente. Vetores retrovirais, no entanto, permanecem muito atrativos, pois integram somente uma cópia do DNA exógeno no genoma da célula infectada (Etches, 1996).

Alguns dos problemas associados com a infecção por retrovírus já foram eliminados com a utilização da técnica denominada virofecção. Esta, consiste na co-transfecção de dois plasmídeos, um dos quais possui somente o DNA exógeno e o outro, os genes que codificam para as proteínas necessárias para a replicação e integração do vetor. Neste sistema, não são produzidas moléculas de RNA do vírus e, portanto, não há a formação de novas partículas virais (Flamant *et al.*, 1994). Este procedimento mostrou um grande potencial para a introdução de modificações genéticas em células da blastoderme de embriões de galinha, sem a produção de vírus infecciosos (Flamant *et al.*, 1994).

### 19.2.3. Células Embrionárias Indiferenciadas (“Embryonic Stem Cells - ES”)

Concomitantemente com o desenvolvimento das técnicas de microinjeção e infecção por retrovírus, foram realizados estudos para estabelecer linhagens celulares, que pudessem participar da formação de animais quiméricos, colonizando as células germinativas. As células embrionárias indiferenciadas (ES) são estabelecidas *in vitro*, a partir do cultivo de células oriundas do botão embrionário de embriões em estágio de blastocisto. Estas células mantêm sua característica de pluripotência e conservam seu cariótipo normal, quando em cultura (Wagner *et al.*, 1985). Genes podem ser eficientemente introduzidos nestas células por transferência direta de DNA ou por meio de retrovírus (Jaenisch, 1988). Quando injetadas em um blastocisto hospedeiro, as células ES transformadas podem colonizar o embrião e contribuir para a formação da linhagem germinativa, originando um animal quimérico para o gene exógeno (Robertson *et al.*, 1986). A possibilidade de seleção prévia, *in vitro*, de um genótipo particular, antes da introdução das células no embrião, constitui o maior benefício desta técnica. Ademais, este método permite inserção sítio-específica do transgene, por meio de recombinação homóloga (Capecchi, 1989). No entanto, a grande desvantagem para a produção de animais transgênicos, é que não se pode prever o destino das células ES e, estas podem não originar as células germinativas. Outro fator importante, é que os animais produzidos são quiméricos e, como no caso da infecção por retrovírus, são necessários cruzamentos para a obtenção de uma linhagem transgênica pura (Gordon, 1989; Pursel & Rexroad, 1993).

Em animais domésticos, células ES foram desenvolvidas em bovinos (Niemann, 1998), suínos e ovinos (Notarianni *et al.*, 1991), no entanto, nenhuma destas células contribuíram para a formação da linhagem germinativa. Em porcos, quimeras foram gerados através da injeção de células ES ou células germinativas primordiais (PGC = progenitores de oócitos e espermatozoides). Bovinos quiméricos também foram obtidos com células ES, no entanto, nenhuma célula germinativa continha o transgene. Camundongos são, ainda, os únicos animais transgênicos derivados de células embrionárias indiferenciadas (Donovan *et al.*, 1997).

### 19.2.4. Espermatozóides como Vetores

Espermatozóides podem ser utilizados, como vetores, para a introdução de genes exógenos no núcleo de ovócitos, no momento da fecundação. Camundongos e suínos transgênicos foram produzidos, a partir da incubação dos espermatozóides, em um meio contendo o DNA exógeno, e com a subsequente utilização destes espermatozóides para a fecundação *in vitro* (Lavitrano *et al.*, 1989) ou inseminação no oviduto (Lauria & Gandolfi, 1993). Trabalhos adicionais demonstraram a presença de genes exógenos em embriões, feto e animais adultos de coelho (Rottmann *et al.*, 1996), bovinos (Gagné *et al.*, 1991; Rottmann *et al.*, 1996; Sperandio *et al.*, 1996), suínos (Sperandio *et al.*, 1996) e galinhas (Nakanishi & Iritani, 1993; Rottmann *et al.*, 1992; Squires & Drake, 1993). No entanto, a integração estável dos genes exógenos no genoma de animais adultos é um evento raro e a eficiência de produção de animais transgênicos é baixa (Pursel & Rexroad, 1993; Squires & Drake, 1993). Evidências sugerem que mudanças na molécula de DNA ocorrem principalmente dentro dos oócitos, representando um passo limitante na produção de animais transgênicos, utilizando espermatozóides como vetores de DNA (Gandolfi, 1998).

### 19.2.5. Biolística

A biolística é um método físico para a introdução de ácidos nucleicos e outras substâncias no interior de células e tecidos intactos, pela aceleração de micropartículas de metal a alta velocidade. Este processo tem sido descrito de diferentes formas e denominado de várias maneiras: bombardeamento de partículas, bombardeamento de micropartículas, aceleração de partículas, biobalística, "gene gun", entre outros. Os inventores deste processo, para uniformizar os diferentes termos e aparatos associados ao disparo de materiais biológicos no interior de células-alvos, denominaram-no biolística (Sanford *et al.*, 1993).

O processo biolístico, inventado em 1984, por E. D. Wolf, N. K. Allen e J. C. Sanford, foi originalmente desenvolvido para introduzir genes exógenos, no genoma nuclear de plantas superiores (Klein *et al.*, 1987). Comparada com outras técnicas de transformação, a biolística pode ser considerada como o sistema que demonstra a menor especificidade quanto uso de genótipos, permitindo trabalhar com espécies antes julgadas de difícil transformação. Apresenta ainda outras vantagens como: bombardeamento simultâneo de muitas células, liberação de altas doses de DNA, co-transformação com dois ou mais plasmídeos, independência quanto ao uso de protocolos específicos de cultura de tecidos e relativa praticabilidade e eficiência da técnica (Klein *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993).

Há muitas formas de aceleração de partículas microscópicas a velocidade altas, como é exigido pelo processo biolístico. Dos vários métodos de aceleração, o que tem-se mostrado mais eficiente é o de aceleração de micropartículas na superfície de um carreador macroscópico ou macrocarreador. O macrocarreador, em todos os métodos, é impulsionado por uma onda de choque. Esta onda pode resultar de: explosão química, explosão elétrica de uma gota d'água, descarga de ar comprimido e choque de gás hélio ou de nitrogênio, gerado pelo mecanismo de ruptura de membrana. O macrocarreador pode ser qualquer objeto pequeno, cuja superfície frontal possa carregar micropartículas e, cuja superfície oposta apresente integridade coesiva bastante, para absorver a energia da onda de choque e suportar aceleração súbita seguida de desaceleração abrupta (Sanford *et al.*, 1993).

O primeiro equipamento desenvolvido utilizava pólvora para acelerar as micropartículas de metal. Estas micropartículas, cobertas de DNA, são colocadas em um macrocarreador de náilon, que é acelerado, dentro de um tubo, pela explosão da pólvora, até atingir um anteparo de impacto. Somente as micropartículas continuam sua trajetória, por uma pequena abertura no anteparo, até atingirem o tecido-alvo (Klein *et al.*, 1987). Todo esse processo ocorre, dentro de uma câmara, sob vácuo parcial. Este modelo básico não permite o controle da velocidade das partículas e, devido às variações na quantidade de pólvora, que acelera o macrocarreador, apresenta alto grau de variabilidade em cada bombardeamento. Este sistema causa também dano apreciável ao tecido-alvo, devido principalmente à onda de choque e ao choque acústico. O uso de peneiras, entre o anteparo de impacto e o tecido, minimiza o dano às células e melhora o perfil de distribuição das partículas (Russel *et al.*, 1992).

Sanford *et al.* (1991) desenvolveram um sistema de bombardeamento, onde uma pressão controlada de gás hélio acelera uma membrana de plástico carregada de partículas (membrana carreadora). Após percorrer curta distância, a membrana carreadora é desacelerada, pelo impacto em uma tela fixa (tela de retenção) e somente as partículas continuam o seu percurso, até atingirem o explante-alvo, sob vácuo parcial. A pressão é controlada por um disco de ruptura, que pode apresentar diferentes espessuras, de acordo com a pressão desejada. A distância, entre o disco de ruptura e a

membrana carreadora, pode ser modificada, permitindo variar a velocidade das partículas, conforme o tipo de tecido-alvo a ser utilizado.

O primeiro trabalho de transferência de genes em animais, utilizando a biolística, surgiu em 1989, onde uma linhagem de células de camundongos foi transformada com o gene *neo*, que confere resistência ao antibiótico geneticina (Zelenin *et al.*, 1989). Desde então, a biolística tem sido utilizada para a transformação de células em cultura, de órgãos isolados e de tecidos de animais vivos (Johnston *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1990 e Zelenin *et al.*, 1991). As aplicações potenciais desta técnica são: análise da expressão de genes e promotores tecidos-específicos, terapia e imunização genéticas e, produção de células e animais transgênicos (Klein & Fitzpatrick-McElligott, 1993).

A utilização da biolística para a produção de animais transgênicos foi demonstrada por Li *et al.* (1995), onde células germinativas primordiais de embriões de galinhas foram bombardeadas com os genes *neo* e o da ovalbumina. Foi detectada a presença dos genes exógenos nos espermatozóides dos frangos nascidos. Estes foram cruzados com galinhas normais e, dos 45 indivíduos G1 nascidos, 10 apresentavam o transgene (22%). Na maioria dos casos, o DNA exógeno desapareceu da prole G1, quando seus indivíduos alcançaram a maturidade sexual, sugerindo que, nestes casos, não houve integração e a transmissão do transgene foi epissomal. Dois outros trabalhos demonstraram a aplicação da biolística em embriões de galinha dentro do próprio ovo (Muramatsu *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1999).

### **19.3. UTILIZAÇÃO DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS**

As técnicas de transgênese em animais foram desenvolvidas e otimizadas, visando basicamente quatro principais linhas de pesquisa:

- ▶ o estudo da regulação e expressão gênica;
- ▶ a utilização de animais transgênicos como biorreatores;
- ▶ a geração de modelos animais para estudos biomédicos;
- ▶ a introdução de novas características genéticas importantes economicamente.

#### **19.3.1. Estudo da Regulação e Expressão Gênica**

Animais transgênicos têm sido amplamente utilizados para a elucidação dos mecanismos moleculares que controlam a expressão e a regulação de diversos genes, durante o desenvolvimento fetal e tecidos adultos. Por exemplo, elementos regulatórios dentro de introns foram descobertos utilizando-se técnicas de transgênese em animais (Brinster *et al.*, 1988; Palmiter *et al.*, 1991); promotores, “enhancers” (amplificadores) e elementos silenciadores de vários genes têm sido identificados e caracterizados e; uma variedade de promotores que controlam a expressão de genes tecido-específicos (por exemplo, em rim, fígado, cérebro, sangue e glândula mamária) são, atualmente, utilizados para direcionar a síntese de proteínas em um tecido de interesse (Dziadek, 1996). Outra grande aplicação da transgenia animal encontra-se na área de biologia do desenvolvimento, onde tem sido possível estudar e construir mapas detalhados de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário de uma variedade de espécies (Babinet, 1997).

### 19.3.2. Utilização de Animais Transgênicos como Biorreatores

A possibilidade de animais transgênicos expressarem proteínas em determinados órgãos, utilizando-se promotores tecido-específicos, torna-os viáveis como biorreatores de proteínas de importância biomédica (Khillan, 1997). Animais domésticos podem servir como biofábricas para a produção em larga escala de proteínas expressas no sangue ou no leite. O isolamento de proteínas expressas nos fluidos (sangue e leite) tem vantagem sobre os tecidos, pois os fluidos são constantemente produzidos e as proteínas são fáceis de recuperar.

Swanson *et al.* (1992) produziram porcos transgênicos para o gene da  $\beta$ -globina humana sob o controle do promotor do gene da  $\beta$ -globina de suínos e, estes expressaram de moderado a altos níveis da  $\beta$ -globina humana no sangue. Entretanto, a expressão de proteínas recombinantes circulantes no sangue mostrou-se prejudicial para a saúde do animal. Desta forma, glândulas mamárias passaram a ser utilizadas, devido a algumas vantagens como: as proteínas do leite não circulam no corpo do animal, o leite poder ser coletado em grandes quantidades e proteínas como  $\kappa$ -caseína e  $\beta$ -lactoglobulina são expressas abundante e exclusivamente na glândula mamária (Khillan, 1997). Assim, proteínas heterólogas podem ser expressas nas glândulas mamárias, clonando-as em vetores que contenham promotores e elementos regulatórios de genes que codificam para proteínas do leite, como a  $\kappa$ -caseína e a  $\beta$ -lactoglobulina (Wilmot *et al.*, 1991).

Diversos trabalhos com ovinos, caprinos e suínos transgênicos têm sido realizados, utilizando-os como biorreatores de proteínas expressas no leite. Por exemplo, o fator IX do coágulo de sangue humano (Clark *et al.*, 1989) e  $\alpha$ 1 antitripsina (Wright & Colman, 1997) foram produzidos no leite de ovelhas transgênicas; o ativador de plasminogênio humano ativo biologicamente, no leite de cabras transgênicas (Ebert *et al.*, 1991); e a proteína C com atividade anticoagulante e a hemoglobina humana, no leite de suínos transgênicos (Sharma *et al.*, 1994; Velandar *et al.*, 1992). No entanto, os níveis de produção destas proteínas foram geralmente muito baixos e variáveis. Desta forma, pesquisas adicionais, para compreender os mecanismos responsáveis pelas variações na produção de proteínas recombinantes são necessárias, antes de utilizar animais transgênicos como biorreatores na indústria biotecnológica (Clark *et al.*, 1998; Khillan, 1997).

### 19.3.3. Geração de Modelos Animais para Estudos Biomédicos

Animais transgênicos também podem ser utilizados para estudar o mecanismo molecular que contribui para a patologia de doenças humanas, assim como, para testar agentes terapêuticos que ou evitem o início da doença, ou diminuía seu progresso ou reduza os sintomas. Camundongos tem sido mais freqüentemente utilizados como modelo animal para um grande número de doenças humanas, entre elas: fibrose cística, arteriosclerose, osteogênese imperfeita,  $\beta$ -talassemia, obesidade, AIDS entre outras (Lowell, 1997; McLachlan & Porteous, 1997; Miller & Rubin, 1997; Dziadek, 1996).

A transgenia em animais também tem sido aplicada na pesquisa de câncer. Uma variedade de oncogenes de origem viril e celular tem sido identificados como causadores de câncer em camundongos transgênicos (Clarke, 1994). Animais transgênicos, portanto, tem se mostrado uma fonte alternativa para a elucidação da influência da genética, fisiologia e ambiente no desenvolvimento do câncer (Kemp, 1997).

Uma outra aplicação, dentro da área de pesquisas aplicadas à saúde humana, é a utilização de animais transgênicos doadores de órgãos, que expressem fatores de inibição à rejeição. Camundongos e suínos transgênicos tem sido engenheirados para expressarem altos níveis de fatores de inibição, na superfície do endotélio de vasos e capilares sanguíneos (Fodor *et al.*, 1994) e, no caso de suínos, servirem como doadores de órgãos para humanos (xenotransplante) (Platt & Logan, 1997).

#### **19.3.4. Introdução de Novas Características Genéticas Importantes Economicamente**

O objetivo nesta área é a produção de animais transgênicos que apresentem características de importância comercial, tais como: maior eficiência na conversão alimentar, maior quantidade de proteína na carne, maior taxa de crescimento corporal, maior produção de carcaça e resistência à doenças (Dziadek, 1996).

Os primeiros experimentos, visando o aumento da taxa de crescimento corporal, foram realizados em suínos (Pursel *et al.*, 1989). Suínos transgênicos foram obtidos para os genes do hormônio do crescimento de bovino (GH) e o do fator liberador do hormônio do crescimento (GHRF). No entanto, efeitos negativos foram observados nestes animais como: reduzida performance reprodutiva, artrite, ulcera gástrica, dermatite, doenças renais e morte prematura (Pursel *et al.*, 1989). Estudos posteriores foram realizados em porcos, ovelhas, gado e peixes transgênicos, utilizando o gene do hormônio do crescimento. No entanto, todos os trabalhos mostraram um limite na manipulação fisiológica destes animais, já previamente selecionados para alta produção. Nenhum dos animais tiveram um aumento significativo no peso corporal, mesmo tendo sido encontrado altos níveis do hormônio do crescimento circulante (nas ovelhas alcançando 3000 ng/ml no sangue). Apesar do grande interesse em produzir animais com maior taxa de crescimento corporal e rendimento de carcaça, existem somente poucos trabalhos sobre a regulação do crescimento de animais pela manipulação do hormônio do crescimento (Ward, 1997).

Outra estratégia potencial para o uso da transgenia em animais é a possibilidade de se alterar a composição do leite, aumentando, por exemplo, a quantidade de proteínas como a  $\kappa$ -caseína. Modificações significativas na composição do leite foram obtidas principalmente camundongos, onde grande quantidade de proteínas heterologas foram expressas no leite. Entretanto, muitos estudos ainda são necessários antes de utilizar animais domésticos transgênicos produzindo diferentes tipos de leite (Mercier & Vilotte, 1997).

Animais transgênicos também têm sido gerados, visando a modificação da estrutura de fibras têxteis, tais como lã e cashmere. O crescimento da lã depende do nível de cisteína, um aminoácido que não é normalmente sintetizado por células animais mas que pode ser obtido na dieta alimentar. Ward *et al.* (1994) transformaram camundongos com dois genes de bactérias, codificadores de proteínas importantes envolvidas na biossíntese da cisteína, e observaram a expressão destas proteínas no trato intestinal. Métodos similares foram tentados em ovinos, mas nenhum animal transgênico que expressasse estas enzimas no intestino foi produzido (Dziadek, 1996). Damak *et al.* (1996), utilizando o gene do fator de crescimento como insulina 1 (IGF1), com o objetivo de afetar o metabolismo folicular e, portanto, a produção de lã, produziram ovelhas transgênicas. Os resultados mostraram um aumento de 6% na produção de lã nos animais transgênicos e nenhuma modificação das características da fibra. Este foi o primeiro trabalho aumentando uma característica de produção, por engenharia genética, sem efeitos deletérios na saúde ou reprodução.



Por fim, uma outra aplicação das técnicas de transgenese é a produção de animais transgênicos resistentes à doenças. O custo com doenças tem sido estimado em cerca de 10 a 20% dos custos de produção total (Muller *et al.* 1997). Historicamente, o controle ou a eliminação de agentes infecciosos em animais domésticos depende do uso de vacinas e drogas, período de quarentena e erradicação. Métodos utilizando transferência de genes tem se tornado atrativo, visto que programas de melhoramento convencional através de seleção têm muitos problemas e são mais demorados. Estratégias de imunização baseada na transferência de DNA têm por objetivo expressar, estavelmente ou transitoriamente, componentes que forneçam ou influenciem o mecanismo de defesa do hospedeiro contra patógenos infecciosos (Muller *et al.* 1997).

Diferentes genes, que conferem resistência a doenças genéticas, já foram identificados e clonados (Crittenden & Salter, 1990). O gene Mx1 de camundongos, por exemplo, que confere resistência seletiva ao vírus da influenza, tem sido utilizado em homens, bovinos, suínos e ratos (Müller & Brem, 1991). A proteína Mx1 inibe o acúmulo de RNAm do vírus e, portanto, animais transgênicos portadores deste gene são resistentes à influenza. Este tipo de translinea é denominada imunização intracelular (Meie & Arnheiter, 1997).

Uma outra alternativa, dentro de técnicas de resistência a doenças, é a utilização de RNA antisense. Esta técnica envolvendo animais transgênicos é limitada (Han & Wagner, 1997). O princípio desta técnica consiste na hibridização do RNA antisense com o RNAm complementar alvo, inibindo a produção de produtos gênicos deletérios (Han & Wagner, 1997). O RNA antisense pode atuar de várias maneiras: 1) impedindo o processamento do RNAm; 2) aumentando a sensibilidade do RNAm à dsRNA ribonuclease; 3) bloqueando a tradução do RNAm no ribossomo; 4) inibindo a exportação de RNAm do núcleo; 5) modificando uma única base do RNAm. O primeiro estudo utilizando RNA antisense foi realizado em camundongos, visando a inibição da replicação do vírus da leucemia (Han *et al.*, 1991). Os resultados mostraram que todos os camundongos transgênicos que expressaram RNA antisense não apresentaram os sintomas da leucemia, enquanto nos camundongos controles, alguns morreram e outros apresentaram diferentes estágios da doença. Outro estudo foi realizado em coelhos contra o adenovírus h5 (Ah5), mas esta técnica é ainda limitada em animais domésticos deletérios (Han & Wagner, 1997).

## **19.4. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE BIOSSEGURANÇA**

Os recentes avanços biotecnológicos que nos permitiu de criar animais geneticamente modificados geraram a necessidade da elaboração de leis regulatórias sobre a produção de animais transgênicos. Os riscos potenciais para o ambiente devem ser levados em consideração. No caso dos animais domésticos existe um consenso que as modificações feitas pela transgene são de baixo risco, entretanto para os outros animais, o risco ecológico potencial tem que ser avaliado. Os organismos governamentais devem estar implicados tanto na criação dos mecanismos de regulação, quanto os das suas aplicações.

Em 20 de dezembro de 1995, o governo brasileiro, através do decreto Nº 1.752 regulamentou a lei Nº 8.974 que estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização para o uso das técnicas de engenharia genética na construção, cultivo, manipulação, transporte e liberação no meio ambiente de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) com o objetivo de proteger a vida e a saúde do homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente. Além de criar a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e dispor sobre sua vinculação, competência e composição.

Todos os textos legais referentes a biossegurança no Brasil tais como leis e decretos federais, resoluções ministeriais, além das instruções normativas estabelecidas pela CTNBio estão reunidos na *site* desta comissão (<http://www.mct.gov.br/ctnbiotec/Default.htm>).

A CTNBio estabeleceu duas instruções normativas (Nº 12 e 13) com normas e apêndices para trabalho em contenção e importação com Animais Geneticamente Modificados (AnGMs) que transcrevemos abaixo<sup>1</sup>:

Estas instruções normativas são satisfatórias neste momento, entretanto a CTNBio se reserva o direito de propor modificações ou a criação de novas instruções caso o trabalho com AnGMs apresente riscos particulares ou não tenha sido previsto pelo conhecimento científico atual. Para a liberação planejada no meio ambiente de Organismos Geneticamente Modificados existe uma Instrução Normativa (Nº 3) e de como proceder a caso aconteça liberação acidental. No entanto no Brasil, os trabalhos com AnGMs são feitos em regime de contenção e até o momento não foi pedida autorização para liberação no meio ambiente ou relatado algum acidente.

### **19.4.1. Instrução Normativa Nº 12**

Instrução Normativa Nº 12, publicada no Diário Oficial da União - DOU - Nº 100-E, de 28 de maio de 1998, Seção 1, Páginas 10-12.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições legais e regulamentares, resolve:

Art. 1º O Trabalho em Contenção com Animais Geneticamente Modificados - AnGMs obedecerá às normas constantes do Anexo da presente Instrução Normativa.

Art. 2º A presente Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Luiz Antonio Barreto de Castro

Presidente da CTNBio

### **ANEXO**

#### **NORMAS PARA TRABALHO EM CONTENÇÃO COM ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS**

##### **Escopo**

Estas normas aplicam-se ao trabalho em contenção com animais geneticamente modificados (AnGMs). Microrganismos e plantas geneticamente modificados bem como a manipulação genética de seres humanos são tratados em regulamentação específica.

A utilização de animais em experimentos que envolvam inoculação de ácido nucléico (ex: vacinas de DNA ou terapia gênica) será tratada em regulamentação específica.

---

<sup>1</sup> Texto livre.

## Definições

Para efeito destas normas, salvo se indicado diferentemente, certos termos serão definidos da seguinte maneira:

- ▶ AnGM: Animal geneticamente modificado é todo aquele que tenha ácido nucléico exógeno intencionalmente incorporado no genoma de suas células germinativas ou somáticas.
- ▶ CQB: Certificado de Qualidade em Biossegurança.
- ▶ CIBio: Comissão Interna de Biossegurança.
- ▶ CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança.
- ▶ NB-A: Nível de contenção necessário para permitir o trabalho com o animal geneticamente modificado.
- ▶ Trabalho em contenção: Atividade com o animal geneticamente modificado que não permita o escape ou liberação para o meio ambiente.
- ▶ Níveis de Biossegurança: Os AnGMs serão classificados como de níveis de biossegurança 1, 2, 3 ou 4.
- ▶ Grupo de Risco: AnGMs do Grupo I são os AnGMs de nível de biossegurança 1 e AnGMs do Grupo II são os AnGMs de níveis de biossegurança 2, 3 ou 4.

## Aplicação das Normas

Estas normas aplicam-se ao trabalho de pesquisa, produção, desenvolvimento tecnológico, ensino e controle de qualidade que utilizem animais geneticamente modificados, em regime de contenção, realizado no território nacional.

Estas normas não se aplicam à liberação planejada do animal geneticamente modificado no meio ambiente, que obedece à norma específica (Instrução Normativa nº 3, publicada no DOU nº 221, de 13 de novembro de 1996, Seção 1, páginas 23691-23694).

As dúvidas sobre a aplicação destas normas devem ser dirimidas junto à CIBio a qual, conforme o caso, solicitará esclarecimentos à CTNBio.

Qualquer que seja o grupo do animal, a instituição deverá requerer à CTNBio extensão de seu CQB para biotérios. No caso de NB-A1 para trabalho em regime de contenção com AnGMs do Grupo I a própria CIBio da instituição poderá autorizar o início de operação do biotério e enviar à CTNBio a planta do mesmo e suas normas de funcionamento em seu relatório anual. Nos casos de NB-A2, NB-A3 ou NB-A4, para trabalho em regime de contenção com AnGMs do Grupo II, a CTNBio realizará visita técnica para aprovação do mesmo.

## Procedimentos

Responsabilidades a serem cumpridas:

- ▶ O responsável legal da entidade e a CIBio ficam encarregados de garantir o fiel cumprimento destas normas no que diz respeito ao trabalho em contenção com animais geneticamente modificados.
- ▶ Instituições que desejarem trabalhar com AnGMs de qualquer Grupo deverão possuir, na sua CIBio, pesquisador com experiência comprovada na manipulação de animais geneticamente modificados.

- ▶ O Pesquisador Principal garantirá o cumprimento destas normas, em conformidade com o CQB e sob supervisão da CIBio. Ele assegurará que todas as pessoas envolvidas no trabalho sejam conscientizadas dos riscos envolvidos e que sejam devidamente treinadas para o cumprimento destas normas.
- ▶ É de responsabilidade da CIBio e de seus membros providenciar para que a CTNBio seja avisada, em qualquer eventualidade, do não cumprimento destas normas.

### **Liberação Acidental De Animais Geneticamente Modificados No Meio Ambiente**

Todas as atividades com animais geneticamente modificados em regime de contenção devem ser planejadas e executadas de acordo com estas normas, de modo a evitar a ocorrência de liberação acidental.

Todo animal geneticamente modificado deverá possuir um marcador genético capaz de, ao ensaio de seu DNA, identificá-lo dentre uma população de animais da mesma espécie. Sempre que possível, animais geneticamente modificados deverão ter marcas permanentes, capazes de identificá-los à inspeção macroscópica.

A ocorrência, entretanto, de qualquer liberação acidental de animal geneticamente modificado, deverá ser imediatamente comunicada à CIBio e à CTNBio, anexando-se relatório das ações corretivas já tomadas e os nomes das pessoas e autoridades que tenham sido notificadas.

O comunicado de tal ocorrência à CTNBio não isenta o proponente de qualquer outra obrigação que possa ter, à luz da legislação ordinária ou estatutos, e de informar as autoridades competentes ou às pessoas que possam ser afetadas.

### **Apresentação de Propostas**

Para qualquer atividade com animais geneticamente modificados classificados como AnGMs do Grupo I ou AnGMs do Grupo II (ver definições abaixo), o Pesquisador Principal deverá encaminhar à CIBio de sua instituição informações detalhadas de acordo com o Modelo para Petição constante do Apêndice desta norma. No caso de AnGMs do Grupo I, a autorização será concedida pela CIBio que, por sua vez, encaminhará informações relativas a essas atividades em seu relatório anual a ser enviado à CTNBio. Caso julgue necessário ou apropriado, a CIBio poderá, a seu critério, solicitar parecer conclusivo da CTNBio sobre autorização para trabalhos com AnGMs do Grupo I.

Para qualquer atividade com AnGMs do Grupo II, o Pesquisador principal submeterá uma proposta escrita à CIBio, que encaminhará o pedido à CTNBio, utilizando o Modelo para Petição constante do Apêndice desta norma. A Secretaria Executiva da CTNBio comunicará à CIBio a decisão da CTNBio.

Uma nova proposta deverá ser apresentada para apreciação da CTNBio sempre que houver alteração no organismo utilizado ou nas condições experimentais.

Trabalhos com AnGMs do Grupo II somente poderão ser desenvolvidos após análise da proposta e autorização pela CTNBio.

A Secretária Executiva estará disponível para esclarecimentos a respeito de qualquer assunto relacionado a estas normas.

### **Classificação dos AnGMS quanto ao nível de biossegurança**

AnGM de Nível de Biossegurança 1: São considerados animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 1 aqueles que, após as manipulações genéticas sofridas, não tiverem alteradas suas características de transmissibilidade de doenças para outras espécies vegetais ou animais, incluindo seres humanos, ou que não apresentarem vantagens seletivas quando liberados no meio ambiente. Animais que, após manipulação genética, passem a conter genoma, ainda que completo, de vírus não levam à doenças infecciosas transmissíveis, serão considerados como de Nível de Biossegurança 1.

AnGM de Nível de Biossegurança 2: São considerados animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 2 aqueles que, após manipulação genética, passem a expressar substâncias sabidamente tóxicas para animais, incluindo o homem, ou vegetais e que, para tais toxinas, existam formas efetivas de prevenção ou tratamento. Também são considerados como de Nível de Biossegurança 2 animais que, após manipulação genética, contenham mais de 75% do genoma de vírus manipulados em Nível de Biossegurança 1 (Instrução Normativa nº 7, publicada no DOU nº 133, de 09 de junho de 1997, Seção 3, páginas 11827-11833), capazes de levar a doenças infecciosas transmissíveis. São ainda considerados animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 2 aqueles que, após manipulação genética, possam ser susceptíveis à infecções que normalmente não ocorram na espécie equivalente (possibilidade de quebra da barreira entre espécies).

AnGM de Nível de Biossegurança 3: São considerados animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 3 aqueles que após a manipulação genética, contenham mais de 75% do genoma de vírus manipulados em Nível de Biossegurança 2 ou 3 (Instrução Normativa nº 7, publicada no DOU nº 133, de 09 de junho de 1997, Seção 3, páginas 11827-11833). Também são considerados como animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 3 aqueles que, após manipulação genética, passem a ser considerados mais aptos à sobrevivência no meio ambiente que os equivalentes não geneticamente modificados.

AnGM de Nível de Biossegurança 4: São considerados animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 4 aqueles que, após manipulação genética, contenham mais de 75% do genoma de vírus manipulados em Nível de Biossegurança 4 (Instrução Normativa nº 7, publicada no DOU nº 133, de 09 de junho de 1997, Seção 3, páginas 11827-11833). São também considerados animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 4 aqueles que, após manipulação genética, passem a expressar substâncias sabidamente tóxicas para animais, incluindo seres humano, ou vegetais e que, para tais toxinas, não existam formas efetivas de prevenção ou tratamento.

### **Classificação dos AnGMS Quanto ao Grupo de Risco**

AnGM do Grupo I: São considerados AnGMs do Grupo I os animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 1.

AnGM do Grupo II: São considerados AnGMs do Grupo II os animais geneticamente modificados de Níveis de Biossegurança 2, 3 ou 4.

## **Nível de Biossegurança para Trabalho com Animais Geneticamente Modificados (NB-A)**

Existem 4 níveis de biossegurança para trabalho com animais geneticamente modificados. O nível de biossegurança do biotério e Salas de Experimentação deverá ser sempre igual ou maior do que o nível de biossegurança do animal geneticamente modificado a ser utilizado.

O credenciamento de biotérios e Salas de Experimentação NB-A1 será realizado pela CIBio da instituição interessada e deverá ser comunicado a CTNBio no seu relatório anual. O credenciamento de biotérios e Salas de Experimentação NB-A2, NB-A3 e NB-A4 será realizado pela CTNBio, após solicitação por parte da CIBio da instituição interessada. Para cada solicitação, a CTNBio deverá nomear um membro para emitir parecer técnico sobre a adequação as normas vigentes em relação ao Nível de Biossegurança do AnGM. Este membro da CTNBio poderá, se assim julgar necessário, sugerir medidas que não estejam previstas nesta Instrução Normativa. Para todos os níveis de segurança os biotérios deverão possuir, no mínimo, as seguintes características:

- ▶ A porta principal deverá estar sempre trancada. O acesso ao biotério deverá ser restrito às pessoas credenciadas, conforme determinado pela CIBio da Instituição.
- ▶ A construção do Biotério deverá ser de tal forma a facilitar limpeza e desinfecção e evitar o acúmulo de poeira.
- ▶ Animais de diferentes espécies e não envolvidos em um mesmo experimento deverão estar alojados em áreas fisicamente separadas.
- ▶ Todas as áreas que permitam ventilação deverão conter barreiras físicas para impedir a passagem de insetos e outros animais.

### **Biotério e Sala de Experimentação NB-A1:**

Adequados para trabalho com animais geneticamente modificados de Nível de Biossegurança 1. Deverão ter as características mínimas descritas acima.

Todo material proveniente dos animais geneticamente modificados deverá ser descartado de forma a impossibilitar seu uso como alimento por outros animais, salvo o caso em que este seja o propósito do experimento, ou se especificamente autorizado pela CIBio, CTNBio ou outra instituição competente, se aplicável.

Toda manipulação deverá ser realizada de forma a evitar a liberação acidental do animal geneticamente modificado no meio ambiente.

### **Biotério e Sala de Experimentação NB-A2:**

Adequados para trabalho com animais geneticamente modificados de Níveis de Biossegurança 1 e 2. Além das condições exigidas para NB-A1, as condições descritas abaixo também deverão ser obedecidas.

- ▶ O Presidente da CIBio deverá estabelecer normas para que apenas as pessoas autorizadas, qualificadas e cientes dos riscos inerentes aos experimentos tenham acesso ao biotério. Quando apropriado, estas pessoas deverão estar vacinadas contra os agentes infecciosos relacionados ao experimento.
- ▶ É necessário que haja uma Ante-Sala entre a área de livre circulação e a área onde os animais estão alojados. Toda a forma de ventilação existente entre a área de circulação livre e a Ante-Sala e entre a Ante-Sala e a Sala dos Animais deverão possuir barreiras físicas que bloqueiem a passagem de insetos ou outros animais.

- ▶ Material contaminado deverá ser apropriadamente acondicionado conforme boas práticas laboratoriais para desinfecção, que poderá ocorrer fora do biotério.
- ▶ Agulhas, seringas ou qualquer outro instrumento que possa causar solução de continuidade da pele deverão ser acondicionados em recipientes resistentes até o momento da desinfecção.
- ▶ É obrigatórios o uso de máscara, gorro, luva, e protetores para os pés. Estes materiais deverão ser sempre descontaminados após o uso.

### **Biotério NB-A3:**

Adequados para o trabalho com animais geneticamente modificados de Níveis de Biossegurança 1, 2 ou 3.

Além das condições exigidas para NB-A2, as condições descritas abaixo também deverão ser obedecidas:

- ▶ O biotério deverá conter, no mínimo, 4 áreas distintas: Ante-Sala, Sala de Materiais, Sala para Animais e Sala de Experimentação.
- ▶ O fluxo de ar deverá ocorrer sempre no sentido da Ante-Sala, Sala de Materiais e, finalmente, Sala para Animais e Sala de Experimentação. O ar insuflado deverá ser esterilizado. A saída de ar também deverá conter filtros esterilizantes para purificação do ar que sai da Sala dos Animais. As Salas dos Animais e de Experimentação deverão, necessariamente, conter pressão de ar negativa em relação à Sala anterior e jogar o ar, após filtragem, para o meio externo.
- ▶ O biotério deverá possuir sistema de controle automático de pressão atmosférica para detectar alterações na pressão atmosférica, sistema este capaz de acionar alarme para acusar o defeito.
- ▶ Os animais deverão ser sempre alojados em sistema de microisoladores (gaiolas com filtro de barragem para microrganismos).
- ▶ Os animais jamais deverão deixar as Salas apropriadas.
- ▶ Nenhum material biológico capaz de propagar o agente infeccioso poderá deixar o biotério antes de eliminada a viabilidade do agente infeccioso (por exemplo, a extração de ácidos nucléicos de órgãos ou células deverá ser realizada dentro do biotério).
- ▶ Todo o líquido efluente do biotério NB-A3 (pias, águas de bebedouros, ralos, autoclaves, etc.) deverá ser descontaminado antes de liberado no sistema de esgotamento sanitário, através do tratamento em caixas de contenção. Este procedimento deverá ser avaliado pela CIBio e aprovado pela CTNBio.
- ▶ Na Ante-Sala e na Sala de Material deverá existir pia e chuveiro, com torneiras que permitam acioná-los sem o uso das mãos. Não deverão existir pias, chuveiros ou qualquer ralo na Sala de Animais ou Sala de Experimentação, para reduzir a possibilidade de escape de material contaminado.
- ▶ A CIBio deverá determinar testes de segurança para permitir o transporte de qualquer material biológico proveniente dos animais para instalações com classificação inferior a NB-3.
- ▶ É necessário que exista a possibilidade de descontaminação de material dentro do biotério. Isto deverá ocorrer através da utilização de autoclave com porta dupla, uma abrindo pela Sala de Materiais e outra abrindo pela Sala de Animais ou Sala de

Experimentação, se esta existir. Deverá existir um incinerador na Sala de Animais ou na Sala de Experimentação.

- ▶ Os animais deverão ser incinerados antes do descarte.
- ▶ Todas as superfícies deverão ser descontaminadas diariamente e sempre após o término de qualquer manipulação. Manipulações independentes em um mesmo dia necessitam descontaminações independentes.
- ▶ Nenhum material biológico, capaz de conter formas viáveis do agente infeccioso, deverá sair do biotério antes de ser descontaminado.
- ▶ É necessário que os usuários utilizem vestimenta apropriada (aventais, gorros, máscaras, sapatilhas e protetores de sapatos, luvas, etc), a ser trocada na Ante-Sala. Isto não corresponde a simplesmente utilizar avental sobre a roupa comum. Não é permitida a entrada ou saída de pessoal sem que ocorra troca de vestimenta. A vestimenta utilizada no biotério deverá ser autoclavada no próprio biotério antes de lavada ou de seu descarte.
- ▶ A CIBio deverá estipular um procedimento de emergência a ser tomado em caso de acidentes laboratoriais, de acordo com o risco dos agentes aos quais os usuários possam ter sido expostos. Dentro de cada Sala deverá haver um sistema de alarme capaz de acionar as medidas necessárias, sem que haja necessidade do usuário acidentado deixar o biotério sem seguir as normas de descontaminação, o que poderia aumentar a gravidade do acidente.
- ▶ Será exigida a obtenção de amostras de soro referência dos usuários antes do início dos trabalhos em ambiente NB-A3. A CIBio deverá propor um sistema de vigilância e monitoramento dos usuários para detecção de possíveis contaminações pelos agentes em uso.

#### **Biotério NB-A4:**

Adequado para o trabalho com animais geneticamente modificados de Níveis de Biossegurança 1, 2, 3 ou 4.

Além das condições exigidas para NB-A3, as condições descritas abaixo também deverão ser obedecidas.

- ▶ O prédio deverá ser uma construção isolada, não ligada a outro prédio. A área onde este prédio se localiza deverá ser patrulhada 24 horas por dia.
- ▶ O acesso a esta área é absolutamente restrito a pessoal com comprovada experiência, certificada pela CIBio e aprovada pela CTNBio.
- ▶ Deverá existir patrulhamento ininterrupto, a cargo da instituição, de forma a controlar não só o acesso ao biotério, mas também a áreas que dão acesso ao biotério. Somente pessoas credenciadas pela CIBio poderão transitar pela área de acesso ao biotério. É também necessária a presença, 24 horas ao dia, de vigilância a ser localizada próximo à porta de entrada do biotério. Além do sistema de acesso por cartão magnético ou códigos digitais, o vigilante deverá solicitar identificação institucional de cada usuário. Todas estas informações deverão ser registradas e arquivadas por um período mínimo igual a 5 vezes ao maior período de incubação das diferentes doenças que possam ser causadas pelos agentes infecciosos aos quais os usuários estão expostos.
- ▶ O acesso ao biotério deverá ser controlado por um sistema que permita a identificação de cada usuário, bem como o horário e tempo de utilização do biotério. Todas as portas deverão permanecer sempre trancadas e sua abertura deverá ser controlada por uso de cartões magnéticos ou códigos digital.



- ▶ O biotério deverá possuir, pelo menos, 6 áreas distintas:
  - 1. Ante-Sala com pressão de ar negativa em relação à área de circulação e capacidade de esterilização do ambiente.
  - 2. Sala de Troca de Vestimenta com três divisões, sendo que um chuveiro fica na divisão central. Na primeira divisão (próxima à Ante-Sala), deverá haver armários individuais para o usuário guardar a roupa. Deverá também haver armários fechados para guardar as roupas a serem utilizadas pelos usuários. Na Sala do Chuveiro, deverá haver chuveiro, pia e capacidade de esterilização do ambiente. Pias e chuveiros deverão ser acionados por sistema independente do uso das mãos. Na terceira divisão deverá haver sacos para acondicionar a roupa já utilizada no laboratório, que deverá ser autoclavada antes de ser descartada.
  - 3. Sala de Materiais com pia e capacidade de esterilização do ambiente. Na Sala de Materiais deverá haver um autoclave para cada Sala de Animal, Sala de Experimentação e Sala de Necropsia existente no biotério, com porta dupla, uma abrindo para a Sala de Materiais e outra para as Salas de Animais, de Experimentação e de Necropsia.
  - 4. Sala de Animais com capacidade de esterilização do ambiente. A passagem entre a Sala de Materiais e a Sala de Animais deverá ser feita por porta dupla, com abertura automática, para que não haja necessidade do uso das mãos.
  - 5. Sala de Experimentação com capacidade de esterilização do ambiente e comunicação, por meio de porta dupla automática, com a Sala de Animais.
  - 6. Sala de Necropsia com incinerador.
- ▶ Não deverão existir pias, chuveiros ou qualquer ralo na Sala de Animais ou Sala de Experimentação, para evitar a possibilidade de escape de material contaminado.
- ▶ Todas as Salas deverão ter pressão de ar negativa em relação à Sala anterior, com sistema de fluxo não permitindo a volta de ar de uma Sala com material contaminado para áreas limpas. Deverá haver sistema de controle automático de pressão do ar, capaz de detectar alterações na pressão atmosférica e acionar sistema de alarme automático, que trave todas as portas do biotério.
- ▶ O sistema de filtração utilizado para exaustão de ar deverá possuir dupla barreira de filtração, sendo que, no caso de mal funcionamento de uma delas, a segunda será suficiente para liberar ar esterilizado.
- ▶ O sistema de ar deverá ser validado por firma com experiência comprovada.
- ▶ O sistema de alimentação de água deverá possuir mecanismos que impeçam o fluxo contrário de água. Todo o sistema de esgotamento sanitário da construção deverá ser independente, com sistema de descontaminação antes do descarte.
- ▶ Ao entrar no biotério o usuário deverá deixar a Ante-Sala e, na Sala de Troca, deixar a vestimenta na 1ª divisão e se vestir com as roupas apropriadas para o biotério (calças, camisas, jalecos, luvas, gorros, máscaras, sapatos e protetores de sapatos, etc) que se encontram esterilizadas. Para sair do biotério o usuário deverá deixar as roupas na Sala anterior à Sala do chuveiro, em recipiente próprio para descontaminação. Todo usuário deverá, obrigatoriamente, tomar banho antes de cada saída do biotério.
- ▶ Nas áreas onde se encontram os animais ou na Sala de Experimentação e na Sala de Necropsia, deverá haver contenção de 100% do ar circulante no ambiente NB-A4, em relação aos usuários. Isto poderá ser obtido por sistema de "linha da vida" ou uso de sistema de contenção total em linha. Assim, no espaço entre as portas que separam a Sala de Materiais e as Salas com ambiente NB-A4, deverá haver espaço para troca de vestimenta, no caso de utilização da "linha da vida". No caso de contenção em linha, a mesma vestimenta poderá ser utilizada.

- ▶ A entrada de qualquer material para as Salas de Animais deverá ser realizada, via autoclave de duas portas, ou o mesmo deverá ser esterilizado antes de sua entrada.
- ▶ O vigia responsável pelo patrulhamento da área de acesso ao biotério deverá estar apto a acionar o esquema de emergência, em caso de acidente, que será informado pelo usuário pelo sistema de alarme.
- ▶ Os animais deverão ser incinerados antes do descarte.
- ▶ Nenhum material biológico capaz de propagar o agente infeccioso poderá deixar o biotério. Qualquer experimento utilizando material biológico deverá ser realizado dentro da Sala de Experimentação.

### **Observação Importante**

A CTNBio poderá, a qualquer momento, nomear uma Comissão Técnica para determinar se as normas aqui estabelecidas satisfazem os critérios de biossegurança para trabalho com animais geneticamente modificados que possam apresentar riscos particulares ou não previstos pelo conhecimento científico atual.

### **Apêndice**

Requerimento para trabalho em contenção com animais geneticamente modificados (AnGMS)

Ilmo. Sr. Presidente da CTNBio/CIBio

- ▶ Nome do Representante Legal da Instituição/Unidade Operativa/Presidente da CIBio.
- ▶ Instituição e Endereço. Fax/Fone/E-mail.
- ▶ Número do CQB.
- ▶ Nome do Pesquisador Principal.

Vem requerer autorização para trabalho em contenção com animais geneticamente modificados (AnGMS), em cumprimento à Instrução Normativa nº 12/98.

- ▶ Informe a espécie do animal a ser geneticamente alterado.
- ▶ Informe o procedimento de alteração genética a ser utilizado.
- ▶ Informe se pretende estabelecer uma colônia com o AnGM.
- ▶ Informe as características do material genético a ser inserido.
- ▶ Descreva as atividades biológicas que adquiridas/perdidas pelo AnGM.
- ▶ Informe a possibilidade de alteração nas características de patogenicidade do AnGM.
- ▶ Informe a possibilidade do AnGM ganhar alguma vantagem seletiva sobre os correspondentes não modificados geneticamente, quando de um possível escape para o meio ambiente.
- ▶ Informe a possibilidade de risco de transmissão de doenças para outros animais, incluindo seres humanos, ou vegetais.
- ▶ Informe se o AnGM passará a expressar alguma proteína com potencial sabidamente tóxico. Se positivo, informe se existe ou não forma de tratamento.

- ▶ Procure subsidiar o parecer da CTNBio esclarecendo aspectos que não foram abordados por este requerimento e que você julgue relevantes para o esclarecimento sobre o nível de biossegurança do AnGM.
- ▶ Inclua literatura científica que possa dar subsídios para o parecer da CTNBio.
- ▶ Data.
- ▶ Assinatura do Pesquisador Principal e do Presidente da CIBio.

### **19.4.2. Instrução Normativa Nº 13**

Instrução Normativa Nº 13, publicada no Diário Oficial da União - DOU - N.º 103-E, de 02 de junho de 1998, Seção 1, Página 28.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições legais e regulamentares, resolve:

Art. 1º A importação de animais geneticamente modificados para uso em trabalhos de contenção obedecerá às normas constantes do Anexo da presente Instrução Normativa.

Art. 2º O cumprimento desta Instrução Normativa não exige o requerente do respeito à legislação específica em vigor para a introdução de animais no país, afeta aos Ministérios da Agricultura, da Saúde ou do Meio Ambiente (art. 7º, Lei 8.974/95).

Art. 3º A presente Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Luiz Antonio Barreto de Castro  
Presidente da CTNBio

### **ANEXO**

#### **NORMAS PARA IMPORTAÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS (AnGMs) PARA USO EM TRABALHO EM REGIME DE CONTENÇÃO**

##### **Escopo**

Estas normas aplicam-se à importação de animais geneticamente modificados (AnGMs). Microrganismos geneticamente modificados (incluindo bactérias, fungos, vírus, clamídias, riquetsias e micoplasmas), linhagens celulares, parasitas e organismos afins são tratados em regulamentação específica.

A obediência a estas normas não exige o importador do cumprimento dos trâmites previstos pela legislação em vigor.

##### **Habilitação para Importação**

A importação será sempre feita por uma entidade que possua CQB - Certificado de Qualidade em Biossegurança (Lei nº 8.974/95, Instrução Normativa nº 1, publicada no DOU nº 174, de 6 de setembro de 1996, Seção 1, páginas 17694-17696), extensivo ao seu biotério.

A importação será efetivada somente para uso em trabalho de contenção pela instituição que realizou a importação. A transferência de AnGM da instituição importadora para outra instituição deverá ser realizada obedecendo as normas de transporte de OGM (Lei nº 8.974/95, Instrução Normativa nº 4, publicada no DOU nº 247, de 20 de dezembro de 1996, Seção 1, páginas 27820-27821).

A habilitação para importação dependerá da classificação do AnGM. O processo de importação do AnGM deverá ser avaliado pela CIBio da instituição responsável pela importação, segundo normas para trabalho em contenção com animais geneticamente modificados (Lei nº 8.974/95, Instrução Normativa nº 12, publicada no DOU nº 100-E, de 28 de maio de 1998, Seção 1, páginas 10 - 12).

É de responsabilidade da CIBio a classificação do animal geneticamente modificado como sendo do Grupo I ou do Grupo II.

Se a CIBio classificar o animal como do Grupo I (AnGM de nível de biossegurança 1), a habilitação será emitida diretamente pela CIBio.

No caso de animais geneticamente modificados do Grupo II (AnGMs de níveis de biossegurança 2, 3 ou 4), a habilitação para importação será dada pela CTNBio, após solicitação por escrito da instituição interessada, em formulário constante do Apêndice.

Os cuidados para transporte e os procedimentos de emergência, no caso de escape ou acidente durante a importação, serão previamente comunicados à CIBio pelo responsável pela solicitação de importação.

As embalagens usadas para o transporte deverão obedecer às normas para transporte de organismos geneticamente modificados (Lei nº 8.974/95, Instrução Normativa nº 4, publicada no DOU nº 247, de 20 de dezembro de 1996, Seção 1, páginas 27820-27821) ou à legislação específica, quando pertinente.

## **Apêndice**

Requerimento de habilitação para importação de animais geneticamente modificados (AnGMs) para trabalho em regime de contenção

Ilmo. Sr. Presidente da CTNBio / CIBio

- ▶ Nome do Representante Legal da Instituição / Unidade Operativa / Presidente da CIBio.
- ▶ Instituição e Endereço / Fax / Fone / E-mail.
- ▶ Número do CQB.
- ▶ Nome do Pesquisador Principal.

Vem requerer habilitação para importação de animais geneticamente modificados (AnGMs) para trabalho em regime de contenção, em cumprimento à Instrução Normativa nº 13. Procure responder de maneira objetiva as seguintes perguntas:

- ▶ Informe a espécie do animal a ser geneticamente alterado.
- ▶ Informe o procedimento de alteração genética a ser utilizado.
- ▶ Informe se pretende estabelecer uma colônia com o AnGM.
- ▶ Informe as características do material genético a ser inserido.

- ▶ Descreva as atividades biológicas que serão adquiridas/perdidas pelo AnGM.
- ▶ Informe a possibilidade de alteração nas características de patogenicidade do AnGM.
- ▶ Informe a possibilidade do AnGM ganhar alguma vantagem seletiva sobre os correspondentes não modificados geneticamente, quando de um possível escape para o meio ambiente.
- ▶ Informe a possibilidade de risco de transmissão de doenças para outros animais, incluindo seres humanos, ou vegetais.
- ▶ Informe se o AnGM passará a expressar alguma proteína com potencial sabidamente tóxico. Se positivo, informe se existe ou não forma de tratamento.
- ▶ Procure subsidiar o parecer da CTNBio esclarecendo aspectos que não foram abordados por este requerimento e que você julgue relevantes para o esclarecimento sobre o nível de biossegurança do AnGM.
- ▶ Inclua literatura científica que possa dar subsídios para o parecer da CTNBio.
- ▶ Data.
- ▶ Assinatura do Pesquisador Principal e do Presidente da CIBio.

## 19.5. CONCLUSÃO

As diversas técnicas de transgênese utilizadas em animais demonstram o interesse dos pesquisadores em conseguir um método eficiente de transferência de genes no menor tempo possível. Dependendo do interesse do estudo e da espécie, diferentes técnicas podem ser aplicadas. Dentre elas, a mais eficiente em mamíferos é a microinjeção em pronúcleos de ovos recém-fertilizados, mas, no entanto, quando se deseja a substituição de um gene, outras técnicas como células ES são mais apropriadas. Assim, dependendo das aplicações, as técnicas de transgenia em animais tem se mostrado bastante útil e com variadas aplicações nas áreas do conhecimento.

Não esperado ou não desejado efeitos da transgenese em animais de laboratório ou domésticos são devidos a: 1) uma incompleta compreensão dos mecanismos regulatórios que são exigidos para um padrão normal de expressão, 2) efeitos na expressão do transgene que depende do sítio de integração do transgene, 3) o conhecimento incompleto de todas as funções fisiológicas de produtos geniosos específicos.

Os resultados de estudos transgênicos para melhorar características em animais domésticos (por exemplo, animais transgênicos para o hormônio do crescimento) demonstram que significativos aumentos na produtividade são frequentemente associados a efeitos deletérios que levam a uma diminuição na performance geral. Pesquisas futuras são necessárias para compreender qual o nível do produto do transgene não irá perturbar as propriedades fisiológicas que são normalmente delicadamente balanceadas nos animais. Esforços combinados de fisiologistas e biólogos moleculares são necessários para compreender quais modificações no metabolismo do animal não iram comprometer sua saúde. Os benefícios e riscos a longo prazo da transgenese devem ser cuidadosamente avaliados.

Apesar da necessidade ainda de muitos estudos, a produção de animais transgênicos tem sido cada vez mais explorada, visando transferir de maneira estável e eficiente o gene de interesse entre espécies diferentes. Pesquisas futuras são necessárias em todas as áreas e o que se deseja é que as modificações genéticas sejam viáveis do ponto de vista econômico e que satisfaçam os preceitos éticos. Como medida preventiva, atualmente uma subcomissão da CTNBio de especialistas de notório saber científico e técnico estão debruçados na elaboração de um código de ética de manipulações genéticas.

O nosso país é um dos poucos do mundo que possuem uma legislação tão bem elaborada e atual. As leis são criadas em respostas as necessidades e aos anseios de uma determinada população, hoje com a economia globalizada as leis tendem a serem universais. O nosso grande desafio é que os nossos avanços neste campo sejam respeitados nos protocolos internacionais.

## 19.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ▶ BABINET, C. Transgenic Strategies for the Study of Mouse Development: an Overview. In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. cap. 56, p. 371-386, 1997.
- ▶ BOSSELMAN, R. A.; HSU, R. Y.; BOGGS, T.; HU, S.; BRUSZEWSKI, J.; NICHOLSON, M.; SCHULZ, J. A.; SEMON, K. M.; RUSHELL, W. & STEWART, R.G. **Germline transmission of exogenous genes in the chicken**. Science, v. 243, p. 533-535, 1989.
- ▶ BRINSTER, R. L.; ALLEN, J. M.; BEHRINGER, R. R.; GELINAS, R. E. & PALMITER, R. D. **Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 85, p. 836-840, 1988.
- ▶ BRISKIN, M. J.; HSU, R. Y.; BOGGS, T.; SCHULTZ, J. A.; RISHELL, W. & BOSSELMAN, R. A. **Heritable retroviral transgenes are highly expressed in chickens**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 88, p. 1736-1740, 1991.
- ▶ CAPECCHI, M. R. **High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells**. Cell, v. 22, p. 479-488, 1989.
- ▶ CHERNY, R. A.; STOKES, T. M.; MEREI, J.; LOM, L.; BRANDON, M. L. & ILLIAMS, R. L. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 569-575, 1994.
- ▶ CLARKE, A. J. **Murine genetic models of human disease**. Current Opinion in Genetic Developmental, v. 4, p. 453-460, 1994.
- ▶ \_\_\_\_\_. **Gene expression in the mammary glands of transgenic animals**. Biochemical Society Symposia, v. 63, p. 133-140, 1998.
- ▶ CLARK, A. J.; BESSOS, H.; BISHOP, J. O.; BORWN, P.; HARRIS, B. S.; LATHE, R.; McCLENAGHAN, M.; PROWSE, C.; SIMONS, J. P.; WHITELAW, C. B. A. & WILMUT, I. **Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep**. Biotechnology, v. 7, p. 487-492, 1989.
- ▶ CRITTENDEN, L. B.; SALTER, D. W. **Expression of retroviral genes in transgenic chickens**. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, v. 41, p. 163-171, 1990.

- ▶ CUNDIFF, L.V.; BISHOP, M.D.; JOHNSON, R.K. Challenges and opportunities for integrating genetically modified animals into traditional animal breeding plans. **Journal of Animal Science**. Genetically modified livestock: progress, prospects and issues. v. 71, p. 20-25, 1993. Supplement, 3.
- ▶ DAMAK, S.; SU, H.; JAY, N. P. & BULLOCK, D. W. **Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1**. *Biotechnology*, v. 14, p. 185-188, 1996.
- ▶ DONOVAN, P. J.; RESNICK, J. L.; CHENG, L. & LOCK, L. F. **Towards the Use of Primordial Germ Cells for Germline Modification**. In: HOUEBINE, L.M. (Ed.) *Transgenic Animals: Generation and Use*. Harwood Academic Publishers, 1997. cap 29, p. 179-187.
- ▶ DZIADEK, M. **Transgenic animals: how they are made and their role in animal production and research**. *Australian Veterinary Journal*, v. 73, p. 182-187, 1996.
- ▶ EBERT, K. M.; SELGRATH, J. P.; DITULLIO, P.; DENMAN, J.; SMITH, T. E.; MEMON, M. A.; SCHINDLER, J. E.; MONASTERSKY, G. M.; VITALE, J. A. & GORDON, K. **Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression**. *Biotechnology*, v. 9, p. 835-838, 1991.
- ▶ ETCHES, R. J. Biotechnology and genetic improvement of poultry. In: **WORLD'S POULTRY CONGRESS**, 20, New Delhi, 1996. Proceedings, vol. 1. New Delhi: World's Poultry Science Association, 1996. p. 295-304.
- ▶ FLAMANT, F.; DEMENEIX, B.; BENOIST, C.; MARKOSSIAN-BELIN, S. & SAMARUT, J. **Virofection: a new procedure to achieve stable expression of genes transferred into early embryos**. *International Journal of Developmental Biology*, v. 38, p. 751-757, 1994.
- ▶ FODOR, W. L.; WILLIAMS, B. L.; MATIS, L. A.; MADRI, J. A.; ROLLINS, S. A.; KNIGHT, J. W.; VELANDER, W. & SQUINTO, S. P. **Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 91, p. 11153-11157, 1994.
- ▶ GAGNE, M.; POTHIER, F. & SIRARD, M. A. **Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes**. *Molecular Reproduction and Development*, v. 29, p. 6-15, 1991.
- ▶ \_\_\_\_\_, A. Gene Microinjection into Bovine Pronuclei. In: HOUEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. cap 7, p. 27-36.
- ▶ GANDOLFI, F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. **Transgenic Research**, v. 7, p. 147-155, 1998.
- ▶ GAVIN, W.G. Gene Transfer into Goat Embryos. In: HOUEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. Cap 5, p. 19-21.
- ▶ GINSBURG, M.; EYAL-GILADI, H. **Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of embryo-forming process**. *Development*, v. 101, p. 209-219, 1987.
- ▶ GORDON, J. W. **Transgenic animals**. *International Review of Cytology*, v. 115, p. 171-229, 1989.

- ▶ GORDON, J. W. & RUDDLE, F. H. **Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei**. *Science*, v. 214, p. 1244-1246, 1981.
- ▶ GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A. & RUDDLE, F. H. **Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 77, p. 7380-7384, 1980.
- ▶ HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D. & BRINSTER, R. L. **Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection**. *Nature*, v. 315, p. 680-683. 1985.
- ▶ HAN, L. & WAGNER, T. A. **The Use of Antisense RNA and Ribozyme Sequences to Prevent Infectious Diseases in Transgenic Animals**. In: HOUDEBINE, L. M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997, cap 72, p. 489-493, 1997.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Inhibition of Moloney murine leukemia virus-induced leukemia in transgenic mice expressing antisense RNA complementary to the retroviral packaging sequences**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 88, p. 4313-4317, 1991.
- ▶ HUGHES, S. H.; KOSIK, E.; FADLY, A. M.; SALTER, D. W. & CRITTENDEN, L. B. **Design of retroviral vectors for the insertion of foreign DNA into avian germ line**. *Poultry Science*, v. 65, p. 1459-1462, 1986.
- ▶ JAENISCH, R. **Germ line integration of moloney leukemia virus: effect of homozygosity at the m-mulv locus**. *Cell*, v. 12, p. 691-696, 1977.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Transgenic Animals**. *Science*, v. 240, p. 1468-1474, 1988.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 71, p. 1250-1254, 1974.
- ▶ JOHNSTON, S. A.; RIEDY, M.; DE VIT, M. J.; SANFORD, J. C.; MCELLIGOTT, S. & WILLIAMS, S. **Biolistic transformation of animal tissue**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, v. 27, p. 11-14, 1991.
- ▶ KEMP, C. J. **The Use of Mouse Knockouts to Study Tumor Suppressor Genes**. In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. cap 60, p. 411-419, 1997.
- ▶ KHILLAN, J. S. **Transgenic animals as bioreactors for expression of recombinant proteins**. *Methods in Molecular Biology*, v. 63, p. 327-342, 1997.
- ▶ KIM, H. S.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. & FIRST, N. L. **Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon ape leukemia virus envelopes**. *Molecular Reproduction and Development*, v. 35, p. 105-113, 1993.
- ▶ KLEIN, T. M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P. A.; & FITZPATRICK-MCELLIGOTT, S. **Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment**. *Bio/Technology*, v. 10, p. 286-291, 1992.
- ▶ KLEIN, T. M. & FITZPATRICK-MCELLIGOTT, S. **Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 4, p. 583-590, 1993.



- ▶ \_\_\_\_\_ . **High-velocity microprojectiles for delivering nucleic into living cells.** *Nature*, v. 327, p. 70-73, 1987.
- ▶ LACEY, M.; ALPERT, S.; HANAHAN, D. **Bovine papillomavirus genome elicits skin tumours in transgenic mice.** *Nature*, v. 322, p. 609-612, 1986.
- ▶ LANZA, R. P.; COOPER, D. K. C. & CHICK, W. L. **Xenotransplantation.** *Scientific American*, v. 277, p. 54-59, 1997.
- ▶ LAURIA, A. & GANDOLFI, F. Recent advances in sperm cell mediated gene transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 255-257, 1993.
- ▶ LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M.; DOLCI, S.; FORACE, M. G. & SPADAFORA, C. **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice.** *Cell*, v. 57, p. 717-723, 1989.
- ▶ LI, Y.; BEHNAM, J. & SIMKISS, K. **Ballistic tranfection of avian primordial germ cell *in ovo*.** *Transgenic Research*, v. 4, p. 26-29, 1995.
- ▶ LOVE, J.; GRIBBIN, C.; MATHER, C. & SANG, H. **Transgenic birds by DNA microinjection.** *Bio/Technology*, v. 12, p. 60-63, 1994.
- ▶ LOWELL, B. B. **Genetically Engineered Mice in Obesity Research.** In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997, cap 65, p. 449-454, 1997.
- ▶ MAHON, K. A.; OVERBEEK, P. A. & WESTPHAL, H. **Prenatal lethality in a transgenic mouse line is the result of a chromosomal translocation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 85, p. 1165-1168, 1988.
- ▶ MARTIN, M. J. & PINKERT, C. A. **Production of Transgenic Swine.** In: PINKERT, C.A. (Ed.) **Transgenic Animals Technology: a Laboratory Handbook.** Alabama: Academic Press Inc., 1994. cap 11, p. 315-337.
- ▶ McLACHLAN, G. & PORTEOUS, D. J. **The Role of Mouse Models in the Development of New Therapies for Cystic Fibrosis.** In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 63, p. 435-444, 1997.
- ▶ MEIER, E. & ARNHEITER, H. **The Use of Host-Derived Antiviral Genes.** In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 71, p. 483-488, 1997.
- ▶ MENCK, M. C.; MERCIER, Y.; CAMPION, E., LOBO, R. B.; HEYMAN, Y.; RENARD, J. & THOMPSON, E. M. **Prediction of transgene integration by noninvasive bioluminescent screening of microinjected bovine embryos.** *Transgenic Research*, v. 7, p. 331-341, 1998.
- ▶ MERCIER, J. C. & VILOTTE, J. L. **The Modification of Milk Protein Composition through Transgenesis: Progress and Problems.** In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 70, p. 473-482, 1997.
- ▶ MILLER, M. W. & RUBIN, E. M. **Transgenic Animals in Artherosclerosis Research.** In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 64, p. 445-448, 1997.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Disease resistance in farm animals.** *Experientia*, v. 47, p. 923-934, 1991.

- ▶ \_\_\_\_\_ . **Antibody Encoding Transgenes** – Their Potential Use in Congenital and Intracellular Immunisation of Farm Animals. In: HOUDEBINE, L.M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. cap 73, p. 495-499, 1997.
- ▶ MURAMATSU, T.; MIZUTANI, Y.; OHMORI, Y. & OKUMURA, J. **Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos *in ovo***. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 230, p. 376-380, 1997.
- ▶ NAITO, M.; AGATA, K.; OTSUKA, K.; KINO, K.; OHTA, M.; HIROSE, K.; PERRY, M. M. & EGUSHI, G. **Embryonic expression of  $\beta$ -actin-lacZ hybrid gene injected into the fertilized ovum of the domestic fowl**. **International Journal of Developmental Biology**, v. 35, p. 69-75, 1991.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection** into germinal disc of fertilized ova. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 167-171, 1994.
- ▶ NAKANISHI, A.; IRITANI, A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 258-261, 1993.
- ▶ NIEMANN, H. Transgenic farm animals get off the ground. **Transgenic Research**, v. 7, p. 73-75, 1998.
- ▶ NOTARIANNI, E.; EVANS, M. J. **Transgenesis and genetic engineering in domestic animals**. In: MURRAY, J. A. H. (Ed.) **Transgenesis: Application of gene transfer**. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 1992. cap. 10, p. 251-281.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep**. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 43, p. 255-260, 1991.
- ▶ PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD, M. G.; BIRNBERG, N. C. & EVANS, R. M. **Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes**. **Nature**, v. 300, p. 611-615, 1982.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice**. **Science**, v. 222, p. 809-814, 1983.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice**. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 88, p. 478-482, 1991.
- ▶ PLATT, J. L. & LOGAN, J. S. **The Generation and Use of Transgenic Animals for Xenotransplantation**. In: HOUDEBINE, L. M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. cap 66, p. 455-460, 1997.
- ▶ PURSEL, V. G. **Techniques and Problems in Producing Transgenic Pigs**. In: HOUDEBINE, L. M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use**. Harwood Academic Publishers, 1997. cap 4, p. 15-17.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Genetic engineering of livestock**. **Science**, v. 244, p. 1281-1288, 1989.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Status of research with transgenic farm animals**. **Journal of Animal Science**. Genetically modified livestock: progress, prospects and issues. v. 71, p. 10-19, 1993. Supplement, 3.

- ▶ RIBEIRO, L. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L.; SCHMIDT, G. S. & COUTINHO, L. L. **In situ DNA transfer to chicken embryos by biolistic.** Genetics and Molecular Biology, v. 22, p. 1-5, 1999.
- ▶ ROBERTSON, E.; BRADLEY, A.; KUCHN, M. & EVANS, M. **Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector.** Nature, v. 323, p. 445-448, 1986.
- ▶ ROTTMANN, O. J.; ANTES, R.; HOFER, P. & MAIERHOFER, G. **Liposome-mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells.** Journal of Animal Breeding and Genetics, v. 109, p. 64-70, 1992.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Liposome-mediated gene transfer via sperm cells-high transfer efficiency and persistence of transgenes by use of liposomes and sperm cells and a murine amplification element.** Journal of Animal Breeding and Genetics, v. 113, p. 401-411, 1996.
- ▶ RUSSEL, J. A.; ROY, M. K. & SANFORD, J.C. **Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficacy of biolistic transformation.** Plant Physiology, v. 98, p. 1050-1056, 1992.
- ▶ SALTER, D.W.; CRITTENDEN, L.B. **Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken.** Theoretical and Applied Genetics, v. 77, p. 457-461, 1989.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Avian leukosis retroviruses and gene transfer into the avian genome.** In: ETCHES, R. J.; GIBBINS, A. M. V. (Ed.) **Manipulation of the avian genome.** Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1993. cap. 9, p. 135-150.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Transgenic chickens: Insertion of retroviral genes into the chicken germ line.** Virology, v. 157, p. 236-240, 1987.
- ▶ SANFORD, J. C.; DEVIT, M. J.; RUSSELL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENING, P. R.; ROY, M. K. & JONHSTON, S. A. **An improved helium-driven biolistic device.** Technique, v. 3, p. 3-16, 1991.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Optimizing the biolistic process for different biological applications.** Methods in Enzymology, v. 217, p. 483-509, 1993.
- ▶ SANG, H. & PERRY, M. M. **Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilized ovum of the hen, *Gallus domesticus*.** Molecular Reproduction and Development, v. 1, p. 98-106, 1989.
- ▶ SHARMA, A.; MARTIN, M. J.; OKABE, J. F.; TRUGLIO, R. A.; DHANJAL, N. K.; LOGAN, J. S. & KUMAR, R. **An isologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic swine.** Biotechnology, v. 12, p. 55-59, 1994.
- ▶ SHUMAN, R. M. & SHOFFNER, R. N. **Gene transfer by avian retroviruses.** Poultry Science, v. 65, p. 1437-1444, 1986.
- ▶ SPERANDIO, S.; LULLI, V.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MAIONE, B.; SPADAFORA, C. & LAVITRANO, M. **Sperm –mediated DNA transfer in bovine and swine species.** Animal Biotechnology, v. 7, p. 59-77, 1996.
- ▶ SQUIRES, E. J. & DRAKE, D. **Liposome-mediated DNA transfer to chicken sperm cells.** Animal Biotechnology, v. 4, p. 71-88, 1993.

- ▶ SWANSON, M. E.; MARTIN, M. J.; O'DONNELL, J. K.; HOOVER, K.; LAGO, W.; HUNTRESS, V.; PARSONS, C. T.; PINKERT, C. A.; PILDER, S. & LOGAN, J. S. **Production of functional human hemoglobin in transgenic swine.** *Biotechnology*, v. 10, p. 557-559, 1992.
- ▶ VELANDER, W. H.; JOHNSON, J. L.; PAGE, R. L.; RUSSELL, C. G.; SUBRAMANIAN, A.; WILKINS, T. D.; GWAZDAUSKAS, F. C.; PITTIUS, C. & DROHAN, W. N. **High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 89, p. 12003-12007, 1992.
- ▶ VICK, L.; LI, Y. & SIMKISS, K. **Transgenic birds from transformed primordial germ cells.** *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 251, p. 179-182, 1993.
- ▶ VIVILLE, S. **Mouse Genetic Manipulation via Homologous Recombination.** In: HOUDEBINE, L. M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 48, p. 307-321.
- ▶ WAGNER, E. F.; COVARRUBIAS, L.; STEWART, T. A. & MINTZ, B. **Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line.** *Cell*, v. 35, p. 647-655, 1985.
- ▶ WALL, R. J. **Transgenic Livestock: progress and prospects for the future.** *Theriogenology*, v. 45, p. 57-68, 1996.
- ▶ WARD, K. A. **The Transfer of Isolated Genes Having Known Functions.** In: HOUDEBINE, L. M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 76, p. 511-518, 1997.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Preventing hair loss in mice.** *Nature*, v. 371, p. 563-564, 1994.
- ▶ WILMUT, I.; ARCHIBALD, A. L.; McCLENAGHAN, M.; SIMONS, J. P.; WHITELAW, C.B.; CLARK, A. J. **Production of pharmaceutical proteins in milk.** *Experientia*, v. 15, p. 905-912, 1991.
- ▶ WRIGHT, G. & COLMAN, A. **Purification of Recombinant Proteins from Sheep's Milk.** In: HOUDEBINE, L. M. (Ed.) **Transgenic Animals: Generation and Use.** Harwood Academic Publishers, 1997. cap 69, p. 469-471, 1997.
- ▶ YANG, N. S.; BURKHOLDER, J.; ROBERTS, B.; MARTINELL, B. & McCABE, D. **In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 87, p. 9568-9572, 1990.
- ▶ ZELLENIN, A. V.; ALIMOV, A. A.; TITOMIROV, A. V.; KAZANSKY, A. V.; GOREDETSKY, S. I. & KOLESNIKOV, V. A. **High-velocity mechanical DNA transfer of the chloramphenicolacetyl transferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and in vivo.** *FEBS Letters*, v. 280, p. 94-96, 1991.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Bacterial  $\beta$ -galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection.** *FEBS Letters*, v. 414, p. 319-322, 1997.
- ▶ \_\_\_\_\_ . **Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection.** *FEBS Letters*, v. 244, p. 65-67, 1989.

