

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Bacharelado em Ciências Biológicas



Trabalho Acadêmico

**Construção de vetores recombinantes contendo promotores
para direcionamento da expressão gênica em *Gallus gallus***

Evelise Sampaio da Silva

Pelotas, 2010

EVELISE SAMPAIO DA SILVA

**CONSTRUÇÃO DE VETORES RECOMBINANTES CONTENDO
PROMOTORES PARA DIRECIONAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM *Gallus
gallus***

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Collares

Co-Orientador: Dra. Simone Simionatto

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vagheti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586c Silva, Evelise Sampaio da
Construção de vetores recombinantes contendo promotores para direcionamento da expressão gênica em Gallus gallus / Evelise Sampaio da Silva ; orientador Tiago Collares, coorientador Simone Simionatto. – Pelotas, 2010. – 39f. :il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Biologia molecular. 2.Ovoalbumina. 3.Promotores gênicos. 4.Ovomucóide. 5.Biofármacos. 6.Betactina.
I.Collares, Tiago. II.Simionatto, Simone. III. Título

CDD: 574.88

Banca examinadora:

Fabiana Seixas, Dra. Universidade Federal de Pelotas

Tiago Collares, Dr. Universidade Federal de Pelotas (Orientador)

Vinícius Farias Campos, Ms. Universidade Federal de Pelotas

Dedicatória

**Ao meu pai Fernando Falcão, meu maior
exemplo de vida e superação.**

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Vinícius Campos, Thaís Collares, Priscila de Leon, Marta Amaral, Cristian Kaefer, Karine Begnini, Breno Gonçalves, Elias Berneira, Fabrício Domenech, Ingrid Aguiar e todos outros que passaram pelo laboratório nesses últimos 5 anos.

Em especial ao professor Deschamps e ao Tiago, pelas oportunidades que me foram dadas nestes anos de convivência e trabalho juntos; à minha co-orientadora Simone pela paciência, sinceridade e dedicação nos momentos mais importantes da execução deste trabalho.

A todos do Centro de Biotecnologia que de alguma forma me auxiliaram ao longo desses anos de pesquisa.

Aos os meus colegas do curso de Biologia pelos momentos agradáveis que passamos juntos e apoio nos momentos difíceis.

À minha mãe Celia pelo apoio constante e à minha irmã Fernanda pelas risadas necessárias para seguir a diante.

Ao CNPq pelo apoio financeiro aos projetos e concessão de bolsa de Iniciação Científica.

Muito obrigada!

Resumo

SILVA, Evelise Sampaio da. **Construção de vetores recombinantes contendo promotores para direcionamento da expressão gênica ao oviduto de *Gallus gallus***. 2010. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O aumento da procura por proteínas recombinantes leva ao desenvolvimento de alternativas de produção, incluindo a utilização de animais como biorreatores. A síntese de proteínas terapêuticas em componentes de ovos de galinhas apresenta vantagens como baixo custo na manutenção das aves e alta concentração de proteínas nos ovos. Os genes das proteínas Ovoalbumina e Ovomucóide são transcritos no oviduto das aves, sob controle do hormônio estrogênio, sendo que representam juntas, mais da metade dos polipeptídeos totais do ovo. As sequências promotoras destas proteínas são alvos importantes em pesquisas que visam a expressão de proteínas na clara do ovo de *Gallus gallus*. O polipeptídeo Betactina é expresso em todas as células de eucariotos e tem sido utilizado como um forte promotor, em substituição o promotor do Citomegalovírus (CMV). O objetivo deste trabalho foi clonar três sequências promotoras dos genes de Ovoalbumina, Ovomucóide e Betactina no vetor comercial *pZsGreen* de expressão em eucarioto. As sequências promotoras foram amplificadas por PCR, e após digestão enzimática, ligadas ao vetor. Os plasmídeos recombinantes foram caracterizados por digestão enzimática e a identidade dos vetores recombinantes construídos *pZsGreen/Ovoalbumina*, *pZsGreen/Ovomucóide* e *pZsGreen/Betactina* foi confirmada por seqüenciamento de DNA em sistema automático MEGABACE. Acredita-se que estes vetores *pZsGreen/Ovoalbumina*, *pZsGreen/Ovomucóide* e *pZsGreen/Betactina* sejam eficientes na expressão de genes de interesse em *Gallus gallus* e que os vetores *pZsGreen/Ovoalbumina* e *pZsGreen/Ovomucóide* otimizem o direcionamento da expressão gênica ao oviduto de fêmeas transgênicas de *Gallus gallus*.

Palavras - chave: promotores gênicos, Ovoalbumina, Ovomucóide, Betactina, biofármacos.

Abstract

SILVA, Evelise Sampaio da. **Construção de vetores recombinantes contendo promotores para direcionamento da expressão gênica ao oviduto de *Gallus gallus***. 2010. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Increased demand for recombinant proteins leads to the development of production alternatives, including the use of animals as bioreactors. The synthesis of therapeutic proteins for components of hen's eggs has advantages such as low cost in maintaining the birds and high concentration of protein in the eggs. The genes of the proteins Ovalbumin and Ovomuroid are transcribed in the oviduct of birds, under control of the hormone estrogen, and together represent more than half of the total egg polypeptides. The promoter sequences of these proteins are important targets for research aimed at the expression of proteins in egg whites of *Gallus gallus*. The Betactin polypeptide is expressed in all eukaryotic cells and has been used as a strong promoter, replacing the promoter of cytomegalovirus (CMV). The objective of this study was to clone three sets of promoters Ovalbumin, Ovomuroid and Betactin commercial *pZsGreen* the vector of expression in eukaryotes. The promoter sequences were amplified by PCR, and after enzymatic digestion, linked to the vector. The recombinant plasmids were characterized by enzymatic digestion and the identity of the recombinant vectors constructed *pZsGreen/Ovalbumin*, *pZsGreen/Ovomuroid* and *pZsGreen/Betactin* was confirmed by DNA sequencing on MegaBACE automatic. It is believed that these vectors *pZsGreen/Ovalbumin*, *pZsGreen/Ovomuroid* and *pZsGreen/Betactin* are efficient in the expression of genes of interest in *Gallus gallus* and the vectors *pZsGreen/Ovalbumin* and *pZsGreen/Ovomuroid* optimize the targeting of gene expression to the oviduct of female transgenic *Gallus gallus*.

Keywords: gene promoters, Ovalbumin, Ovomuroid, Betactin, biopharmaceuticals.

Sumário

1	Introdução.....	8
2	Objetivos.....	10
2.1	Objetivo Geral	10
2.2	Objetivos Específicos	10
3	Revisão de Literatura.....	11
3.1	Animais Transgênicos Biorreatores	11
3.1.1	Galinha doméstica (<i>Gallus gallus</i>)	12
3.2	Promotores Gênicos.....	13
3.3	Vetores Plasmidiais.....	15
4	Material e Métodos	18
4.1	Vetor de expressão e delineamento dos <i>primers</i>	18
4.2	Extração de DNA genômico	18
4.3	Reação em Cadeia da Polimerase.....	19
4.4	Clonagem das sequências promotoras no vetor <i>pZsGreen</i>	20
4.4.1	Digestões e Ligação do inserto ao vetor.....	20
4.4.2	Transformação por Eletroporação	21
4.4.3	Seleção e Caracterização dos Clones Recombinantes	21
4.5	Transfecção <i>in vitro</i> em células Vero	22
4.6	Extração de DNA plasmidial em larga escala	22
5	Resultados.....	24
6	Discussão	30
7	Conclusão.....	33
8	Referências.....	34

1 Introdução

A transgênese permite a adição de uma única informação genética exógena conhecida no genoma, com a expressão controlada do gene inserido, bem como a inativação e a substituição específica de um único gene no genoma receptor (HOUDENBINE, 2005a). Em meados da década de 80 teve início o uso de insulina humana recombinante produzida em *Escherichia coli* para o tratamento de diabetes, desde então outras drogas e metodologias vem sendo estudadas e melhoradas. Porém a expressão em *E. coli* apresenta limitações por não permitir modificações pós-traducionais necessárias para algumas proteínas (BRESSAN et al. 2008; MIRALLES et. al., 2009). O aumento da procura global por proteínas recombinantes leva ao desenvolvimento de alternativas de produção, incluindo a utilização de animais transgênicos como biorreatores.

A maioria das aves transgênicas já produzidas é oriunda de estudos com vetores retrovirais, no entanto essas aves foram virêmicas e impróprios para a produção de produtos farmacêuticos. A síntese de proteínas terapêuticas em componentes de ovos da espécie *Gallus gallus* apresenta vantagens como pouco tempo de incubação dos ovos, alta concentração de proteínas e glicosilação adequada das proteínas (BONGALHARDO, 2005; LEE et al., 2007; LILLICO et al., 2007).

De acordo com Hirose et al. (2006), Ovalbumina (OA) é uma glicoproteína expressa no ovo constituindo 54% dos polipeptídios totais do mesmo. O gene da Ovoalbumina é transcrito no oviduto sob controle do hormônio estrogênio (BUHI, 2002) e possui importante papel nutricional no ovo (CAMPOS et al., 2003). Segundo Rupa e Mine (2006) a glicoproteína Ovomucóide (OM) é um componente termoestável, com o maior potencial alergênico do ovo, e representa 11% das proteínas totais do mesmo. Tanto OA quanto OM estão relacionadas a processos alérgicos, no entanto a primeira tem sido referenciada como modelo nos estudos imunológicos da alergia ao ovo (HIROSE et al., 2006) devido à sua abundância.

O direcionamento da expressão de genes de interesse para o oviduto de galinhas, utilizando as regiões promotoras de OA e OM é uma estratégia promissora para a produção de biofármacos. Na construção dos plasmídeos recombinantes, foi utilizado o vetor comercial *pZsGreen* (Clontech) que possui o gene repórter

fluorescente ZsGreen isolada de *Zoanthus sp.* Como controle foi utilizada a sequência promotora do gene da proteína Betactina de *Gallus gallus*, visto que este promotor apresentou maior eficiência que o Citomegalovírus (CMV) em estudos anteriores (GARG et al., 2004; SANJAY, et al., 2004; CHAPMAN et al., 2005).

As construções gênicas *pZsGreen/OA*, *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/Bt* foram caracterizadas e a expressão da proteína fluorescente foi testada através de cultivo *in vitro* em células Vero. Este trabalho está inserido em um projeto do grupo de pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal, que visa a produção e purificação de eritropoetina humana recombinante (rhEPO) em ovos de galinhas transgênicas. Os vetores construídos neste trabalho serão utilizados na clonagem do gene que codifica para a eritropoetina humana, sendo esta a primeira etapa para a obtenção do produto final que é a rhEPO.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Clonar as sequências promotoras dos genes de Ovoalbumina, Ovomucóide e Betactina de *Gallus gallus* no vetor de expressão *pZsGreen*, denominando-os respectivamente, *pZsGreen/OA*, *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/Bt*.

2.2 Objetivos Específicos

- Delinear *primers* para a amplificação de sequências promotoras de Ovoalbumina, Ovomucóide e Betactina de *Gallus gallus*.
- Amplificar as regiões promotoras de Ovoalbumina, Ovomucóide e Betactina.
- Clonar as sequências promotoras amplificadas no vetor *pZsGreen*.
- Caracterizar os três plasmídeos recombinantes *pZsGreen/OA*, *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/Bt* através de digestão enzimática, reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de DNA.
- Testar a eficiência das construções *pZsGreen/OA*, *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/Bt* através da expressão *in vitro* em células Vero.

3 Revisão de Literatura

3.1 Animais Transgênicos Biorreatores

Sabe-se que deficiências na produção natural de polipeptídeos específicos ou a síntese de mutantes não-funcionais, pode comprometer o correto funcionamento de um organismo (MIRALLES et. al., 2009). Com isso há um aumento da procura global por proteínas recombinantes para uso farmacêutico, o que leva a um aumento nas pesquisas para o desenvolvimento de alternativas de produção, incluindo a utilização de animais transgênicos como biorreatores (LILLICO et al., 2007).

A tecnologia do DNA recombinante vem utilizando bactérias e leveduras para a produção de moléculas de interesse farmacológico, devido, ao avançado conhecimento da estrutura e funcionamento desses microrganismos e por serem técnicas relativamente simples e de baixo custo (MIRALLES et al., 2006). Muitas proteínas eucarióticas sofrem modificações pós-traducionais em sua estrutura que as tornam biologicamente ativas (LODISH et al., 2005). Algumas proteínas necessitam de transformações pós-traducionais para tornarem-se estáveis no organismo eucarioto (MIRALLES et. al., 2009).

Animais geneticamente modificados são importantes ferramentas em pesquisas aplicadas a áreas como a terapia gênica, xenotransplantes, melhoramento genético e produção de produtos farmacêuticos em animais biorreatores (MANZINI, et.al., 2006). De acordo com Houdenbine (2005b), o sucesso da transgênese depende da definição de questões técnicas como a transferência e integração do DNA exógeno, a substituição de genes endógenos e a expressão do transgene, no entanto o mecanismo que leva a uma alta frequência de integração do DNA exógeno não é conhecido.

A geração de animais transgênicos com o intuito de produzir proteínas de importância farmacológica em fluidos corporais surgiu na década de 80 com Hammer e colaboradores (COLLARES; SEIXAS, 2005). Segundo Miralles et. al., (2006) a incorporação de alternativas de produção de drogas recombinantes, como a utilização de animais biorreatores, poderia satisfazer as demandas crescentes da

indústria farmacológica. A expressão de proteínas terapêuticas utilizando as sequência de regulação da síntese de polipeptídeos secretados em tecidos já foi demonstrada em caprinos (HAN et al., 2009), bovinos (YANG et al., 2008; WANG et al., 2008) e frangos (HARVEY; IVARIE, 2003; LILLICO et. al., 2007).

Sangue (HOVEST et al., 2004), leite (HUANG, et al., 2007), urina, plasma seminal e claras de ovos, são exemplos de fluidos alvos para a produção de biofármacos em animais transgênicos em escala industrial (HOUDEBINE, 2000; COLLARES et al., 2007). A glândula mamária foi o primeiro foco de pesquisas para a produção de biofármacos devido ao elevado nível de expressão e o grande volume de leite produzido pelos animais. No entanto, a expressão de biofármacos em sistemas de mamíferos tem várias desvantagens como uma área relativamente grande de criação, longo período de maturação sexual, além de que a purificação de uma proteína específica do leite é um procedimento caro, pois exige a remoção de níveis elevados de gordura e outras substâncias endógenas (KAMIHIRA, et al., 2005). Espécies de aves, como galinhas e codornas, no entanto, evitam muitos desses problemas e têm sido estudadas como alternativas de animais transgênicos biorreatores (HARVEY; IVARIE, 2003).

As aves da espécie *Gallus gallus* tem sido um interessante modelo biológico, há mais de 100 anos, por ser um importante instrumento no estudo do desenvolvimento embrionário de vertebrados e devido a sua importância econômica (BONGALHARDO, 2005; ANTIN et al., 2007).

3.1.1 Galinha doméstica (*Gallus gallus*)

Nas últimas décadas as aves têm se destacado como biorreatores devido ao baixo custo de manutenção, pequeno espaço requerido para criação e pouco tempo de geração da progênie (HARVEY; IVARIE, 2003; LEE et al., 2007).

O sistema reprodutivo interno das galinhas é formado por um ovário e um oviduto, fisiologicamente funcionais, localizados na cavidade abdominal. O oviduto é composto por três partes: o infundíbulo, onde ocorre a fertilização; o *magnum* é a região responsável pela secreção de albúmen e o istmo é a região onde se formam as membranas da casca, já a casca do ovo se forma no útero. O oviduto sofre

interferência de vários hormônios esteróides, produzidos pelos ovários das aves, que atuam na secreção do albúmen, síntese da gema pelo fígado e mobilização de cálcio dos ossos para a formação da casca dos ovos (RUTZ et al., 2007).

Existem diversas vantagens na produção de biofármacos nos ovos de galinhas domésticas, entre elas estão: postura média de 330 ovos por animal/ano, riqueza protéica do ovo, glicosilação adequada das proteínas-alvo e imunogenicidade reduzida no produto final (BONGALHARDO, 2005; COLLARES; SEIXAS, 2005; LILLICO et al., 2007). Além disso, sabe-se que o ovo de galinha possui mais de 40 proteínas diferentes e é um ambiente naturalmente estéril, o que favorece a produção de proteínas de interesse, pois permite uma vida longa da proteína recombinante sem que haja perda da sua atividade (CAMPOS et al., 2003; HARVEY; IVARIE, 2003; COLLARES; SEIXAS, 2005).

A clara do ovo pode ser caracterizada como um sistema constituído de vários polipeptídios globulares em uma solução aquosa, sendo os principais constituintes as Ovoalbuminas (OA) A1 e A2, Ovomucóide (OM), ovoglobulinas G1, G2 e G3 e ovotransferrina ou conalbumina (ALLEONI, 2006). Segundo Harvey e Ivarie (2003), a clara de ovo contém, em média, 3,5 g de proteína, dos quais metade provém do gene da ovalbumina.

3.2 Promotores Gênicos

Os genes apresentam além das sequências codificadoras das proteínas, sequências regulatórias, regiões que determinam o início e a eficiência da transcrição (LIN; BARBOSA, 2002). A expressão gênica em organismos eucariotos é regulada por sequências de DNA, que podem ser elementos localizados próximos aos sítios de iniciação e transcrição, ou sequências mais distantes dos genes regulados por elas. Também chamadas de regiões promotora proximais, de acordo com Lodish et al.(2005), os promotores gênicos são regiões, que situam-se de 100 a 200 pares de bases antes da sequência iniciadora de um gene e sinalizam onde deve ser iniciada a transcrição (ZAHA et al., 2000; KARP, 2005).

Os promotores gênicos, por serem regiões do genoma responsáveis pelo direcionamento da expressão gênica, são importantes ferramentas utilizadas na

tecnologia do DNA recombinante. A introdução de uma sequência exógena pode, teoricamente, direcionar a expressão gênica para qualquer região do genoma (HOUDENBINE, 2005a). Essas sequências promotoras, isoladas do gene que as compõem, modificadas ou não, e inseridas a montante de um gene de interesse servem para direcionar a expressão gênica ao local referente à região promotora utilizada.

De acordo com Alleoni e Antunes (2004), a OA corresponde a 54% dos polipeptídios totais da clara do ovo. É uma fosfoglicoproteína com aproximadamente 45kDa e sensível a elevadas temperaturas (HIROSE et al. 2006). O gene da OA é ativamente transcrito no oviduto, sendo que a proteína é sintetizada em células tubulares do magnum das aves, sob controle de hormônios esteróides (BUHI, 2002; MORSHED et al., 2006). Quanto à função desta proteína é importante destacar seu papel nutricional no ovo, bem como sua participação nas propriedades imunes e alergênicas para o ser humano (CAMPOS et al., 2003). O gene tem sido usado como um sistema modelo para desenvolvimento hormonal e regulação tecido-específica de altos níveis de expressão gênica (MORSHED et al., 2006). Assim sendo, o uso da sequência promotora do gene de OA é uma alternativa interessante na expressão de proteínas heterólogas na clara do ovo de *Gallus gallus*.

Outra região promotora relevante para o direcionamento da expressão gênica para o *magnum* de aves é a da glicoproteína Ovomucóide (OM) que possui peso molecular aproximado de 28kDa e tem cerca de 186 aminoácidos (ALLEONI, 2006). Segundo Rupa e Mine (2006), OM é um componente termoestável e constitui 11% das proteínas totais do mesmo. OM é o maior componente alergeno do ovo de galinha. A sequência do gene Ovomucóide, assim como da Ovoalbumina apresenta pelo menos sete íntrons, que variam em tamanho de 230bp a 1100bp. Tanto OA quanto OM têm sua síntese regulada por hormônios esteróides (LINDENMAIER et al., 1979).

A actina é uma proteína citoplasmática abundante e altamente conservada em células eucarióticas (KOST; THEODORAKIS; HUGHES, 1983), onde desempenha funções como motilidade e contração celular. A Betactina (Bt) é a isoforma mais comum na maioria das células não musculares, segundo Höfer, Ness e Drenckhahn (1997). Por ser um componente citoplasmático, o gene da Bt, tem

sido utilizado como um promotor para expressão em eucarioto (KOST; THEODORAKIS; HUGHES, 1983). De acordo com Garg et al. (2004) e Chapman et al. (2005), o promotor da Betactina apresenta melhor desempenho que o promotor citomegalovírus (CMV) e tem sido utilizado em conjunto com CMV para garantir uma expressão gênica mais acentuada (SANJAY, et al., 2004). Vetores contendo a sequência de Bt têm mostrado uma ótima expressão em diversas culturas de células e tecidos (GARG, et al., 2004).

3.3 Vetores Plasmidiais

A tecnologia do DNA recombinante, conta hoje, com diversos tipos de vetores de clonagem originados de material genético bacteriano e viral (MANZINI, et.al., 2006). Um fator relevante a ser considerado na escolha do vetor é quanto ao limite de tamanho do fragmento a ser clonado.

A maioria das aves transgênicas já produzidas é oriunda de estudos com vetores retrovirais, no entanto muitos desses animais foram impróprios para a produção de produtos farmacêuticos, devido a viremia (HARVEY; IVARIE, 2003). Além disso, os baixos níveis de expressão alcançados com vetores retrovirais e a suscetibilidade destes ao silenciamento gênico impulsionaram as pesquisas com outros vetores, em busca de um melhor desempenho (KAMIHIRA, et al. 2005).

Os plasmídeos são moléculas extracromossomais de DNA circular dupla fita, de replicação autônoma, que ocorrem naturalmente em bactérias e leveduras (LODISH et al., 2005). Essas moléculas atuam na transferência de material genético exógeno para o interior das células e a cada divisão da célula hospedeira, o DNA plasmidial é duplicado, ficando nas células-filhas cópias do mesmo (LODISH et al., 2005). Para estudos de expressão gênica utilizam-se vetores que apresentam um gene que codifica para uma característica conhecida (DELLAGOSTIN; SEIXAS, 2005).

Existem algumas características essenciais dos vetores de expressão, como a presença de uma origem de replicação em eucariotos (ORI), um ou mais genes de resistência a antibióticos e um sítio de múltipla clonagem (MCS), constituído por sítios para endonucleases de restrição (BATISTA, 2008). O sucesso da produção de

proteínas recombinantes em animais biorreatores depende da integração do gene exógeno ao genoma do animal e para isso, o vetor deve manter sua estrutura estável durante as divisões celulares para garantir, principalmente, a transmissão do transgene para a prole (MANZINI, et.al., 2006).

O vetor utilizado neste trabalho é o plasmídeo comercial *pZsGreen1-1* (Fig. 1), derivado do vetor de expressão em procariotos pUC19. Os vetores pUC podem ser usados para expressar genes transformados em *Escherichia coli* (TURNER et al., 1997), pois possuem ORI em *E. coli*. Para a otimização da expressão em mamíferos, o *pZsGreen1-1* teve a substituição do aminoácido Asparagina por uma Metionina, para melhorar a eficiência da emissão de fluorescência da proteína verde ZsGreen1, derivada do invertebrado marinho *Zoanthus* sp. (*pZsGreen1-1 Vector Information*). Essa propriedade de fluorescência permite que esse sistema de "gene repórter" seja utilizado para avaliar a expressão gênica *in vivo* (LIN; BARBOSA, 2002). A facilidade com que as proteínas fluorescentes podem ser expressas e rastreadas por mudanças fenotípicas, as torna modelos ideais para estudos experimentais (ALIEVA et al., 2008).

A sequência codificadora da ZsGreen é flanqueada por um sítio de múltipla clonagem (MCS – *Multiple Cloning Site*) no sentido 5' – 3', sendo que antes do início do MCS há uma origem de expressão em eucariotos. Este vetor apresenta ainda um gene de resistência ao antibiótico Canamicina e Neomicina para propagação e seleção de clones.

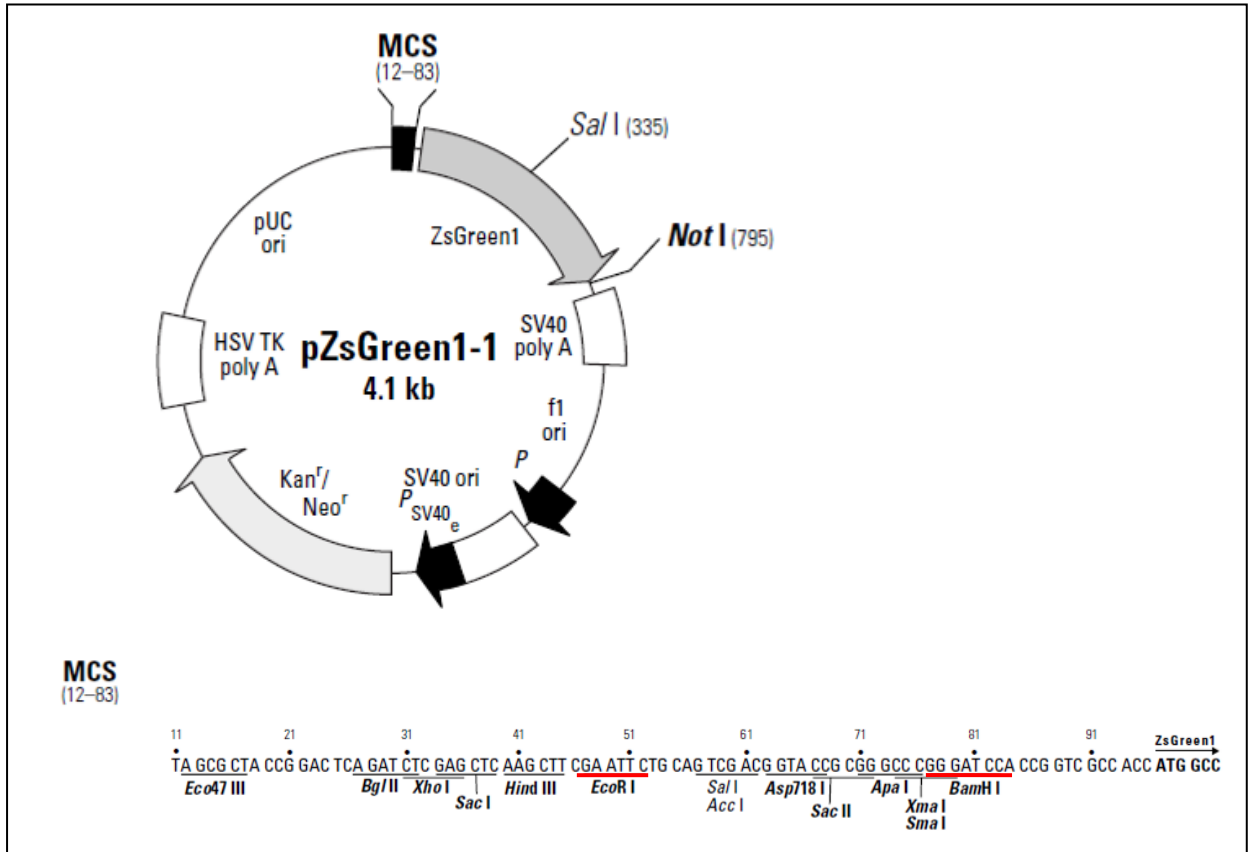


Figura 1 - Desenho esquemático do vetor *pZsGreen1-1* (Clontech®).

Fonte: *pZsGreen1-1 Vector Information*, 2009.

4 Material e Métodos

4.1 Vetor de expressão e delineamento dos *primers*

O vetor utilizado neste trabalho foi o plasmídeo comercial *pZsGreen1-1* (Clontech), que apresenta uma origem de replicação em eucariotos, sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e o gene que codifica para a proteína verde fluorescente, ZsGreen, derivada do invertebrado marinho *Zoanthus* sp.

Para a amplificação de regiões promotoras Betactina (Bt), Ovoalbumina (OA) e Ovomucóide (OM) de *Gallus gallus*, três pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados, com o auxílio do software VectorNTI 11.0 (Invitrogen), baseados em informações depositadas no GenBank. Foram acrescentados aos *primers forward* e *reverse* sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, respectivamente.

4.2 Extração de DNA genômico

Com o auxílio de um tubo de vidro do tipo “Vacuteiner” com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA), foram coletados aproximadamente 2mL de sangue, de um vaso da parte interna da asa, de um exemplar adulto de *Gallus gallus*¹. Para extrair o DNA genômico das células sanguíneas, foi utilizado o Kit *Tissue & Cells genomicPrep Mini Spin* (GE – Healthcare), conforme segue. O material coletado foi dividido em quatro alíquotas de 500µL, centrifugadas por 1min a 14.000rpm. Após, as células foram ressuspendidas em 100µL de PBS, adicionados 50µL de Solução de Lise I com 10µL de Proteinase K. Em seguida os tubos foram agitados no vórtex, centrifugados a 2.000rpm por 10s e incubados por 1h em banho-maria a 56°C. Após esse período foram acrescentados 5µL de RNase agitadas e incubadas por 15min a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 500µL de Solução de Lise II, e após rápida agitação, incubados por 10min a temperatura ambiente.

O conteúdo de cada microtubo passou por colunas, presentes no kit, através de centrifugação a 11.000rpm por 1min, em seguida 500µL de Tampão de Lavagem

¹ Procedimento realizado em conformidade com as normas de Ética e Biossegurança do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta universidade.

foram adicionados às colunas e centrifugado a 11.000rpm por 3min. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5mL, foi adicionado 30µL de Tampão de Eluição cada. Após 1min de incubação a temperatura ambiente as colunas foram centrifugadas a 11.000rpm por 1min, para a liberação do DNA genômico.

O DNA de *Gallus gallus* foi armazenado no freezer a -20°C. Uma alíquota de 5µL foi aplicada em Gel de Agarose 0,8% corado com GelRed (Uniscience) para verificação da concentração e qualidade do mesmo. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad) com tampão TBE (Tris-borato-EDTA) a 100V por 35min. O gel foi visualizado em um transiluminador de luz UV.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase

As sequências promotoras foram amplificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o auxílio da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen), utilizando como molde o DNA extraído de *Gallus gallus*. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *PTC-100 Peltier Thermal Cycler*. A reação foi realizada para um volume final de 25µL, contendo: 0,2µL de Enzima Taq DNA polimerase (2U), 2,5µL de tampão 10X da enzima, 1,0µL de dNTP's (0,2mM), 1,0µL de MgCl₂ (2,5mM), 1,0µL de cada *Primer* (10pmol), 1,0µL de DNA molde (50ng) e 17,3µL Água Milli-Q. Como controle negativo das reações, foi adicionado 1,0µL água Milli-Q no lugar de DNA molde.

A ciclagem utilizada foi: desnaturação (94°C por 5min), seguido por 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1min, anelamento por 1min (tab. 1) e extensão à 72°C por 1min, seguidos da extensão final a 72°C por 7min.

Tabela 1 - Temperaturas de anelamento dos *primers* utilizadas na amplificação das regiões promotoras de Bt, OA e OM.

Promotores	Temperatura
Bt	55°C
OM	48°C
OA	55°C

O tamanho dos fragmentos amplificados por PCR foi analisado através da migração em gel de agarose 0,8%, utilizando como marcador de massa molecular DNA Ladder 1Kb (Invitrogen), juntamente com 3µL de tampão de amostra (azul de bromofenol e glicerol), contendo GelRed (Uniscience). Posteriormente, as sequências amplificadas foram purificadas com o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE - Healthcare). O produto da reação foi homogeneizado com 500µL de Solução de Captura de DNA, transferidos para colunas acopladas a tubos coletores de 1,5mL e centrifugados a 14.000rpm por 30s. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e 500µL de Solução de Lavagem foi adicionado à coluna, sendo centrifugada como citado anteriormente.

Em um novo microtubo de 1,5mL, foi adicionado 40µL de uma solução de eluição Tris e EDTA (TE) 1X, foi centrifugado a 14.000rpm por 1min. A qualidade e a pureza das amostras foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed.

4.4 Clonagem das sequências promotoras no vetor *pZsGreen*

4.4.1 Digestões e Ligação do inserto ao vetor

As seqüências promotoras Bt, OA e OM amplificadas por PCR e o vetor *pZsGreen* foram clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Para isto foram preparadas, separadamente, reações contendo: 1µL de *EcoRI*, 3µL do tampão da enzima, 10µL do DNA a ser digerido e 6µL de água Milli-Q. Essas reações permaneceram por 1h no banho-maria a 37°C. Foi realizada a inativação enzimática a 56°C por 15min, posteriormente adicionado 1µL de *BamHI*, 3µL do tampão da enzima 10 X, 6µL de água Milli-Q e incubadas por 20h a 37°C. Após a digestão as sequências promotoras foram ligadas ao vetor com o auxílio da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), em reação contendo: 3µL vetor, 6µL do promotor, 1µL da enzima T4 DNA ligase, 4µL do tampão da enzima e 6µL de água Milli-Q, 15°C por cerca de 20h.

4.4.2 Transformação por Eletroporação

Alíquotas de 50µL de *Escherichia coli* TOP10 eletrocompetente com 1µL do produto das ligações foram adicionadas a uma cubeta de eletroporação de 0,2cm, mantidas em gelo. A transformação ocorreu no eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad,USA) com parâmetros: 2.5KV , 25µF e 800Ω. Após a transformação, foi adicionado 500µL de meio Luria-Bertani (LB) e incubadas, sob agitação, a 37°C por 90min. Logo após o cultivo foi plaqueado em meio LB sólido contendo 20µL de Canamicina (50µg/mL) e incubado a 37°C por cerca de 16hs.

4.4.3 Seleção e Caracterização dos Clones Recombinantes

Para a triagem de clones recombinantes, foi realizada a técnica de microprep (JOUGLARD et al., 2002), a qual consiste em lise rápida com fenol-clorofórmio das colônias transformadas. Os sobrenadantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed. Os possíveis clones recombinantes foram expandidos em meio 10mL de meio LB líquido suplementado com 100µg de canamicina (50µg/mL) e mantidos sob agitação à temperatura de 37°C por 16hs.

Foi realizada uma extração de DNA plasmidial utilizando os componentes do Kit *GFXTM Micro Plasmid Prep* (Amersham Bioscience). A cultura contendo os clones foi distribuída em tubos de 1,5mL e centrifugada a 14.000rpm por 30s. O *pellet* foi ressuscitado em 300µL da Solução I, por agitação no vórtex, adicionado 300µL da Solução II e misturado por inversão (15 vezes). Em seguida foi adicionado 600µL da Solução III, agitados por inversão e centrifugados por 5min a 14.000rpm. O sobrenadante foi transferido para colunas que foram centrifugadas por 1min a 14.000rpm, foram adicionados 400µL de Solução de Lavagem e centrifugado a 14.000rpm por 1min. Posteriormente foi adicionado 40µL de TE 1X para a eluição do DNA plasmidial. A qualidade do DNA dos plasmídeos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed.

A caracterização dos clones recombinantes foi realizada através de digestão enzimática e PCR do DNA plasmidial extraído. Para a confirmação da identidade

dos plasmídeos recombinantes foi realizado sequenciamento automático de DNA por eletroforese capilar utilizando dideoxinucleotídeos marcados com o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* pelo sistema de análise de DNA MegaBACE - MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

4.5 Transfecção *in vitro* em células Vero

A fim de verificar a se as construções gênicas estavam funcionais, foi realizado um teste de expressão da proteína fluorescente *in vitro*, através de um cultivo em células de rim de macaco (Vero). Como controle positivo na padronização da técnica de imunofluorescência foi utilizado o plasmídeo *pEFGP-N1* que contém a gene da proteína GFP sob controle do promotor CMV. Após confluência de 90%, as células Vero foram transfectadas com os vetores *pEFGP-N1* utilizando lipofectamine™2000. Após 48h de incubação, a expressão da proteína GFP foi avaliada através de visualização em microscópio para imunofluorescência. Após a padronização da técnica, foi realizada a transfecção com os plasmídeos *pZsGreen/Bt*, *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/OA*.

4.6 Extração de DNA plasmidial em larga escala

Os vetores caracterizados foram expandidos em 300mL de LB líquido, mantido sob agitação a 37°C e posteriormente submetidos à extração de DNA em larga escala utilizado Kit *Plasmid DNA Purification NucleoBond Xtra Midi/Maxi* (Macherey-Nagel©).

As culturas foram centrifugadas 5.000rpm por 10min a 4°C. Foi adicionado 12mL de tampão EQU (para equilibrar as colunas). Os *pellets* formados foram ressuspendidos em 8mL de tampão de Ressuspensão (RES) por agitação, após foram adicionados 8mL de Solução de Lise, gentilmente misturado por inversão dos tubos (5 vezes) e incubado a temperatura ambiente por 5min. Em seguida foi adicionado 8mL de Solução de Neutralização e misturado por inversão (15 vezes).

Os tubos, após centrifugação a 5.000rpm por 10min, tiveram os sobrenadantes adicionados às colunas e o líquido saiu por ação da gravidade.

Transcorrido o período de fluxo do material, foram aplicados 5mL de tampão EQU nas colunas. Após as colunas receberam 8mL de Solução de Lavagem e, em seguida, 5mL de Solução de Eluição.

Para concentrar o DNA eluído, foram acrescentados 0,7 volumes de isopropanol e misturados por agitação no vórtex. Para essa etapa o kit conta com seringas de 30mL e NucleoBond® finalizadores acoplados na extremidade de saída de líquido. Foram retirados os êmbolos das seringas, anexados os finalizadores e preenchidas as seringas com o DNA eluído. Após, foram inseridos os êmbolos e pressionados, rejeitando o conteúdo da saída. Os êmbolos foram novamente retirados para adição de 2mL de etanol 70%. Por fim foram adicionados à seringa 1mL de TE 1X para a eluição do DNA.

5 Resultados

O DNA extraído do sangue de *Gallus gallus* foi utilizado com molde nas três reações de PCR, cujos resultados estão apresentados na Fig. 2. O tamanho esperado dos fragmentos amplificados era de 613pb, utilizando os *primers* de OA, 618pb para OM e 390pb para Bt.

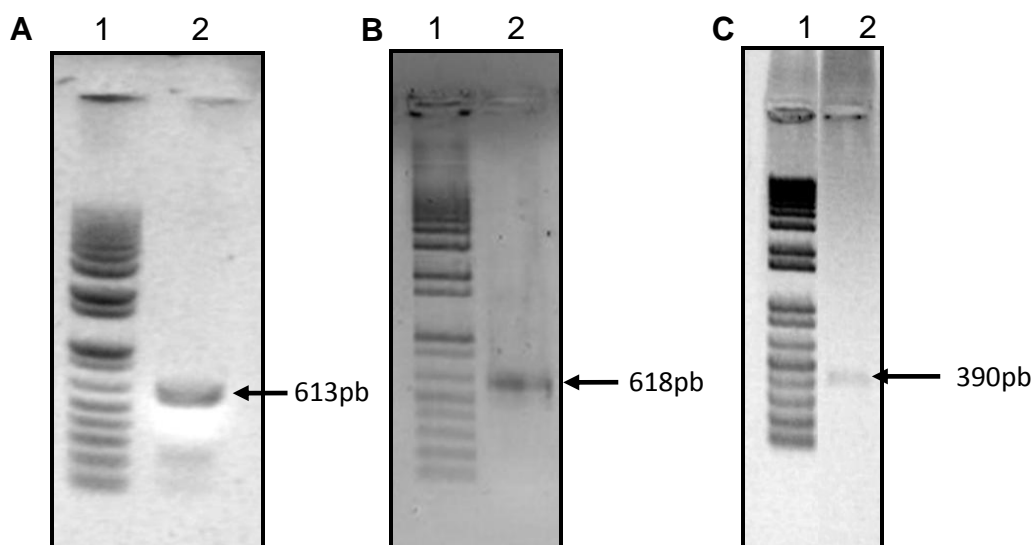


Figura 2 - Géis de agarose 0,8% corados com GelRed. Nas colunas 1 marcador de massa molecular de DNA Ladder 1Kb (Invitrogen); Nas colunas 2, dos painéis A, B e C produtos amplificados por PCR de OA, OM e Bt, respectivamente. As setas indicam o tamanho aproximado dos fragmentos.

Após a purificação do produto obtido na reação de PCR, este foi digerido e ligado ao vetor *pZsGreen1-1*. A molécula resultante foi transformada em células de *E. coli* TOP 10 eletrocompetentes e, estas, crescidas em meio LB líquido à 37°C, conforme descrito no item 5.4.3. Através de eletroforese em gel de agarose 0,8% foi realizada a triagem de possíveis clones recombinantes de OA (Fig. 3A), OM (Fig.3B) e Bt (Fig.3C). As colônias foram caracterizadas como recombinantes de acordo com a migração no gel, sendo que as de menor massa molecular foram desconsideradas.

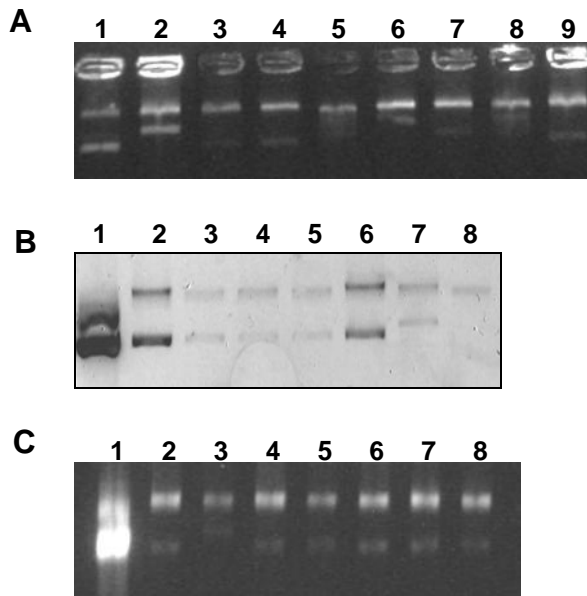


Figura 3 - Gel de agarose 0,8% corado com GelRed demonstrando o *screening* das colônias transformadas. No painel A, nas colunas 2, 6 e 8 possíveis clones recombinantes de OA; Em B, a coluna 7 selecionada como recombinante de OM; Em C, a colônia 3 apresenta possível recombinante de Bt.

O DNA plasmidial das colônias possivelmente recombinantes foi extraído, digerido com *Bam*HI e *Eco*RI, conforme descrito no item 4.4.1. Na digestão enzimática (Fig. 4) é possível observar que houve a liberação, em todos plasmídeos, de um fragmento de cerca de 5000pb, correspondente ao tamanho do vetor *pZsGreen1-1*. O vetor contendo a sequência promotora de OA liberou um inserto de, aproximadamente, 600pb; já os vetores contendo a sequência promotora de OM e Bt, liberam fragmentos maiores que o esperado, 1000pb e de cerca de 1600pb, respectivamente.

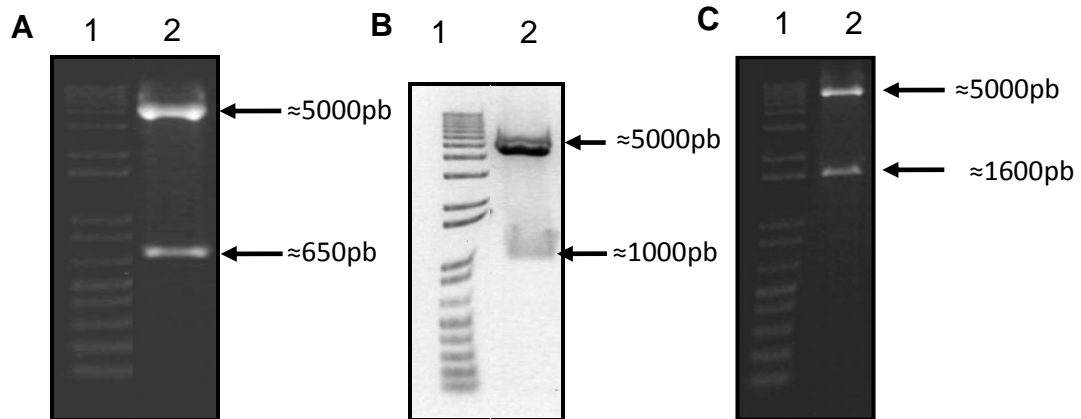


Figura 4 - Géis de agarose 0,8% corados com GelRed, das digestões enzimáticas dos plasmídeos recombinantes. Nas colunas 1, marcador DNA Ladder 1Kb (Invitrogen); Os painéis A, B e C apresentam, na coluna 2, os clones recombinantes de OA, OM e Bt, respectivamente.

Os plasmídeos foram também confirmados por PCR, utilizando o DNA plasmidial extraído das colônias recombinantes como molde. O produto das ampliações por PCR foi purificado e pode ser visualizado na Fig. 5.

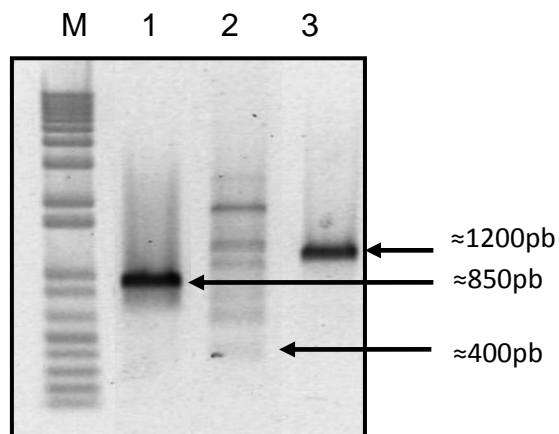


Figura 5 - Gel de agarose 0,8% corado com GelRed. Coluna M, marcador DNA Ladder 1Kb (Invitrogen). Nas colunas 1, 2 e 3 estão os produtos da amplificação dos plasmídeos recombinantes de OA, Bt e OM, respectivamente.

Na Fig.6 é possível visualizar a expressão da proteína GFP em microscópio para imunofluorescência nas células transfectadas com o plasmídeo *pEFGP-N1*, para padronização da técnica. Com os plasmídeos construídos a expressão da ZsGreen foi visualizada apenas com os promotores da Bt e OA (Fig. 7). As células transfectadas com o plasmídeo contendo o promotor ovomucóide não expressaram a proteína fluorescente.

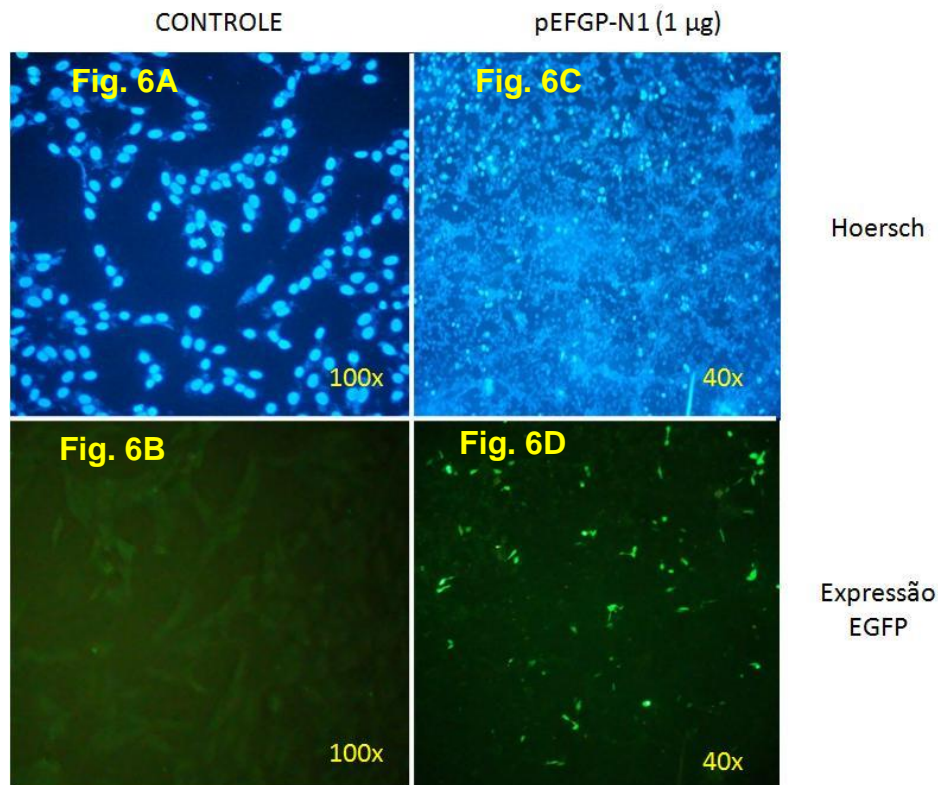


Figura 6 - Imunofluorescência realizada com *pEFGP-N1*. Fig. 7A e 7B, células Vero com e sem Hoersch, respectivamente; Fig. 7C e 7D, células Vero transfectadas com 1µg de *pEFGP-N1* com e sem Hoersch, respectivamente. Figura 7D, demonstra a expressão da GFP em células Vero.

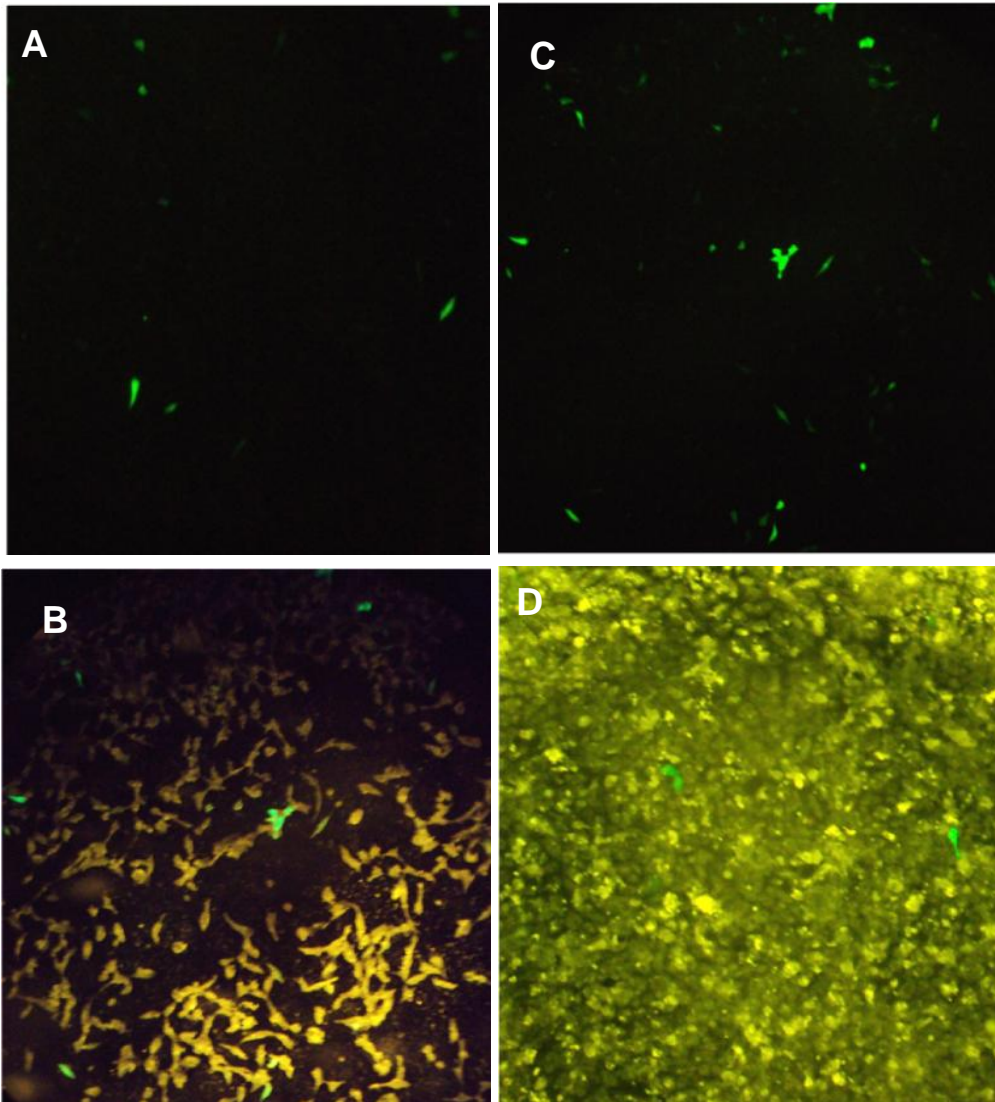


Figura 7 - Imunofluorescência de células Vero transfetadas com os vetores 1 μ g de *pZsGreen/Bt* e *pZsGreen/OA*. Os painéis A e B, mostram células Vero transfetadas com o *pZsGreen/Bt* expressando a proteína ZsGreen. Em C e D, células Vero transfetadas com o *pZsGreen/OA* expressando a proteína ZsGreen.

Os plasmídeos caracterizados enzimaticamente e por PCR, foram submetidos ao sequenciamento de DNA. As sequências resultantes foram alinhadas com outras disponíveis no Banco de Dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) através de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), confirmando a identidade dos vetores recombinantes. A extração de DNA plasmidial em larga escala (Fig. 8) resultou em aproximadamente 1000 μ g/mL de cada vetor recombinante.

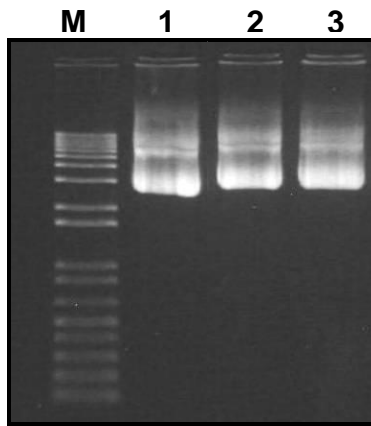


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed, com marcador de massa molecular DNA Ladder 1Kb (Invitrogen) na coluna M. DNA plasmidial extraído em larga escala, na coluna 1 *pZsGreen/OA*; 2 *pZsGreen/OM*; coluna 3 *pZsGreen/Bt*.

6 Discussão

A transgênese possui diversas aplicações, entre elas pode-se citar o estudo da função e mecanismos de ação de genes, terapia gênica e produção de biofármacos. O desenvolvimento de animais transgênicos visando à produção de proteínas vem sofrendo avanços significativos nos últimos anos, tanto nos métodos de geração quanto nas construções gênicas utilizadas.

Uma etapa significativa da transgênese animal é a construção das moléculas recombinantes que carrearão o transgene para o interior das células do hospedeiro. Os genes contêm múltiplos sinais para que haja uma transcrição correta, porém estes não estão totalmente elucidados e sua associação em construções pode levar a transgenes inativos ou pouco ativos (HOUDENBINE, 2005b). Neste sentido estudos preliminares devem ser feitos, de modo a definir a região promotora a ser utilizada e o vetor de expressão adequado.

Numerosos sistemas de vetores estão atualmente em uso para a modificação genética, mas todos eles dependem da integração de genes exógenos no genoma do animal. Um vetor ideal deve manter-se estável estruturalmente e não deve conter sequências de DNA viral ou codificar para proteínas virais (MANZINI et al., 2006), nesse sentido o uso de vetores plasmidiais torna-se uma boa alternativa.

Nesse trabalho foram clonadas no vetor de expressão em eucariotos *pZsGreen1-1*, três diferentes regiões promotoras sendo que, o promotor da Betactina serve de controle, pois direciona a expressão para todas as células eucarióticas. A utilização deste promotor possibilita uma fácil visualização da proteína verde fluorescente *ZsGreen* no animal transgênico. A utilização de genes repórter aumenta a eficiência do processo na produção de transgênicos, pois permite a seleção de animais positivos (com a presença do transgene funcional). Além disso, descendentes de um animal transgênico expressando uma proteína fluorescente fornecerá tecidos geneticamente marcados, o que seria muito útil para a pesquisa básica, onde tais células são necessárias (YIN et al., 2008).

A geração de peixes transgênicos foi obtida por Farlora et al. (2009) através da clonagem do promotor da Betactina num vetor de expressão contendo a região codificadora da proteína EGFP (*Enhancer Green Fluorescent Protein*). Eles

obtiveram três gerações de peixes expressando a proteína em vários tecidos, incluindo os germinativos.

Hasegawaa et al. (2009) descreveram a visualização *in vivo* de proteínas fluorescentes em células tumorais utilizando o modelo medaka (*Oryzias latipes*), através da transfecção de suas células com dois vetores de expressão, um contendo gene que codifica a proteína EGFP e outro a ZsGreen, sob controle dos promotores citomegalovírus humano e Betactina de medaka, respectivamente. As proteínas foram altamente expressas em quase todas as células de ambas as linhagens celulares e eles notaram que a proteína ZsGreen apresenta maior fluorescência que a EGFP e, além disso, a atividade transcricional do promotor de Betactina/medaka foi superior em comparação com o promotor CMV.

Harvey e Ivarie (2003) produziram β -lactamase em ovos de galinhas transgênicas utilizando o promotor CMV em vetor retroviral. Já Lillico et al. (2007) obtiveram aves transgênicas através de vetores, também de origem viral, mas contendo a região regulatória do gene da OA para controlar a expressão de duas proteínas terapêuticas.

Os promotores dos genes das proteínas Ovoalbumina e Ovomucóide direcionam a expressão especificamente às células do oviduto do animal. A seqüência regulatória mínima exigida para expressão restrita ao oviduto *in vivo* não foi definido para o gene da OA (LILLICO et al., 2007). Vários autores já relataram a transmissão germinativa de transgene em pintos utilizando vetores lentivirais (MCGREW et al., 2004; CHAPMAN et al., 2005; LILLICO et al., 2007) e retrovirais (HARVEY et al., 2002; HARVEY; IVARIE, 2003; KOO et al., 2006; LEE et al., 2007). Não há registros de construções gênicas utilizando o vetor *pZsGreen* e os promotores Bt, OA e OM para a geração de aves geneticamente modificadas.

Nos testes de expressão com células Vero era esperado observar a expressão da ZsGreen nos plasmídeos *pZsGreen/Bt*, uma vez que o mesmo induz a expressão em todas as células eucarióticas. A expressão pouco significativa da proteína ZsGreen nas células transfectadas com o plasmídeo *pZsGreen/OA*, pode ser explicada pelo fato de que a RNA polimerase das células Vero não é muito específica e reconheceu fracamente o promotor de OA. As células transfectadas com o plasmídeo contendo o promotor OM não expressaram a ZsGreen.

Para avaliar se a expressão da ZsGreen nos vetores *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/OA* é específica para células do oviduto de galinhas, será realizado a transfecção *in vitro* de células Vero com adição de hormônios como a β -estradiol, corticosterona e insulina buscando com isso verificar se a indução da expressão nestas células é aumentada com a adição dos hormônios, mimetizando o que acontece *in vivo*. Outra estratégia testada será o cultivo primário de células de oviduto de fêmeas *Gallus gallus*, para isso será feita uma adaptação a partir do protocolo descrito por Gao et al (2005).

A molécula recombinante contendo o promotor de melhor desempenho nestes ensaios preliminares, terá a sequência codificadora da proteína ZsGreen substituída por outra de um gene de interesse. Os vetores construídos neste trabalho serão utilizados na clonagem do gene que codifica para a eritropoetina humana, sendo esta a primeira etapa para a obtenção do produto final que é a rhEPO. Espera-se que a molécula *pZsGreen/Bt* otimize o direcionamento da expressão gênica para as células epiteliais e, *pZsGreen/OA* e *pZsGreen/OM* para as células do oviduto de *Gallus gallus* para a geração de aves transgênicas biorreatoras.

7 Conclusão

- Os *primers* delineados amplificaram as sequências promotoras de Ovoalbumina, Ovomucóide e Betactina de *Gallus gallus*.

- A clonagem dos promotores Bt, OA e OM foi realizada com sucesso o que resultou na construção dos vetores *pZsGreen/Betactina*, *pZsGreen/Ovoalbumina* e *pZsGreen/Ovomucóide*.

- Os três plasmídeos recombinantes *pZsGreen/OA*, *pZsGreen/OM* e *pZsGreen/Bt* foram caracterizados pelos três métodos propostos.

- As células transfectadas com o plasmídeos contendo os promotores Bt e OA expressaram a proteína ZsGreen.

8 Referências

- ALIEVA, N. O.; KONZEN, K. A.; FIELD, S. .F.; MELESHKEVITCH, E. A.; HUNT, M. E.; RAMIREZ, V. B.; MILLER, D. J.; WIEDENMANN, J.; SALIH, A.; MATZ, M. Diversity and Evolution of Coral Fluorescent Proteins. **PLOS ONE**, v.3, n. 7, e2680, 2008.
- ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Albumen Foam Stability and S-Ovalbumin Contents in Eggs Coated with Whey Protein Concentrate. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.2, p. 105-110, 2004.
- ALLEONI, Ana Claudia Carraro. Albumen Protein and Functional Properties of Gelation and Foaming. **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p.291-298, 2006.
- ANTIN P. B.; KAUR, S.; STANISLAW, S.; DAVEY, S.; KONIECZKA, J. H.; YATSKIEVYCH, T. A.; DARNELL, D. K. *Gallus* Expression In Situ Hybridization Analysis: A Chicken Embryo Gene Expression Database. **Poultry Science**, n.86, p.1472-1477, 2007.
- BATISTA, Michel. **Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda**. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BONGALHADO, Denise Calisto. Produção de aves transgênicas. In: **Animais Transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. p. 209-236.
- BRESSAN, F. F.; MIRANDA, M. S.; BEM, T. H. C.; PEREIRA, F. T. V.; BINELLI, M.; MEIRELLES, F. V. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.240-250, 2008.
- BUHI, William C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**, n.123, p.355–362, 2002.
- CAMPOS, C. M.; HAMAD, A.; AMANTE, E.; THAPON, J.; NAU, F.; DUBIARD, C. Protein profile in freeze-dried chicken embryo eggs with different periods of development. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, n. 40(supl), p.9-13, 2003.
- CHAPMAN, S. C.; LAWSON, A.; MACARTHUR, W. C.; WIESE, R. J.; LOECHEL, R. H.; BURGOS-TRINIDAD, M.; WAKEFIELD, J. K.; RAMABHADRAN, R.; MAUCH, T. J.; SHOENWOLF, G. C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. **Development**, n.132, p.935-940, 2005.
- COLLARES, Tiago; SEIXAS, Fabiana. Biorreatores: proteínas recombinantes produzidas a partir de animais transgênicos. In: **Animais Transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. p.190-207.

COLLARES, T.; SEIXAS, F.K.; CAMPOS, V.F.; CAVALCANTI, P.V.; DESCHAMPS, J.C. Animais transgênicos biorreatores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.4, p.462-478, 2007.

DELLAGOSTIN, Odir; SEIXAS, Fabiana. Fundamentos de Biologia Molecular. In: **Animais Transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. p. 09-31.

FARLORA, R.; KOBAYASHI, S.; FRANÇA, L.R.; BATLOUNI, S.R.; LACERDA, S.M.S.N.; YOSHIKAWA, G. Expression of GFP in transgenic tilapia under the control of the medaka β -actin promoter: establishment of a model system for germ cell transplantation. **Animal Reproduction**. v.6, n.3, p.450-459, 2009.

GAO, B.; SUN, H.; SONG, C.; WANG, Z.; CHEN, Q.; SONG, H. Transfection and expression of exogenous gene in laying hens oviduct *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n. 2, p. 137-141, 2005.

GARG, S.; ORAN, A. E.; HON, H.; JACOB, J. The Hybrid Cytomegalovirus Enhancer/Chicken β -actin Promoter along with Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances the Protective Efficacy of DNA Vaccines. **The Journal of Immunology**, n.173, p.550–558, 2004.

GIUSTI, C. L. L.; GOMES, Z. M. F.; OLIVEIRA, A. A.; ZIBETTI, C. D. D. **Teses, dissertações e trabalhos acadêmicos: manual de normas da Universidade Federal de Pelotas**, 2006.61f.

HAN, Z.; WU, S.; LI, Q.; LI, J.; GAO, D.; LI, K.; LIU, Z. W.; ZHAO, H. Efficient Human Growth Hormone Gene Expression in the Milk of Non-transgenic Goats. **Folia Biologica (Praha)**, v.55, p. 17-22, 2009.

HARVEY, A. J.; SPEKSNIJDER, G.; BAUGH, L. R.; MORRIS, J. A.; IVARIE, R. Consistent Production of Transgenic Chickens Using Replication-Deficient Retroviral Vectors and High-Throughput Screening Procedures. **Poultry Science**, v.81, p.202–212, 2002.

HARVEY, A. J.; IVARIE, R. Validating the Hen as a Bioreactor for the Production of Exogenous Proteins in Egg White. **Poultry Science**, v. 82, p. 927–930, 2003.

HASEGAWA, S.; MARUYAMA, K.; TAKENAKA, H.; FURUKAWA, T.; SAGAI, T. A medaka model of cancer allowing direct observation of transplanted tumor cells *in vivo* at a cellular-level resolution. **PNAS**, v.106, n.33, p.13832–13837, 2009.

HIROSE, J.; DOI, Y.; KITABATAKE, N.; NARITA, H. Ovalbum-Related Gene Y Protein Bears Carbohydrate Chains of the Ovomuroid type. **Bioscience Biotechnology, Biochemistry**, n.70, p.144-151, 2006.

HOUDEBINE, Louis-Marie. Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Research**, n.9, p.305–320, 2000.

HOUDEBINE, Louis-Marie. Métodos de gerar animais transgênicos e controle da expressão gênica. In: **Animais Transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005a. p. 81-113.

HOUDEBINE, Louis-Marie. Relations between animal transgenesis and reproduction. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p.363–376, 2005b.

HÖFER, D.; NESS, W.; DRENCKHAHN, D. **Sorting of actin isoforms in chicken auditory hair cells**. *Journal of Cell Science*, n.110, p.765-770, 1997.

HOVEST, L.G.; MULLER, S.; MINOIA, R.; WOLF, E.; ZAKHARTCHENKO, V.; WENIGERKIND, H.; LASSNIG, C.; BESENFELDER, U.; MULLER, M.; LYTTON, S.D.; JUNG, G.; BREM, G. Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. **PNAS**, v.101, n.18, p.6858-6863, 2004.

HUANG, Y.J.; HUANG, Y.; BALDASSARRE, H.; WANG, H.; LAZARIS, A.; LEDUC, M.; BILODEAU, A.S.; BELLEMARE, A.; CÔTÉ, M.; HERSKOVITS, P.; TOUATI, M.; TURCOTTE, C.; VALEANU, L.; LEMÉE, N.; WILGUS, H.; BÉGIN, H.; BHATIA, B.; RAO, K.; NEVEU, N.; BROCHU, E.; PIERSON, J.; HOCKLEY, D.K.; CERASOLI, D.M.; LENZ, D.E.; KARATZAS, C.N.; LANGERMANN, S. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. **PNAS**, v.104, n.34, p.13603-13608, 2007.

JOUGLARD, S.D.; MEDEIROS, M.A.; VAZ, E.K.; BASTOS, R.G.; CUNHA, C.W.; ARMOA, R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, H71, p.234, 2002.

KAMIHIRA, M.; K, ONO; ESAKA, K.; NISHIJIMA, K.; KIGAKU, R.; KOMATSU, H.; YAMASHITA, T.; KYOGOKU, K.; IJIMA, S. High-Level Expression of Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein in Serum and Egg White of Genetically Manipulated Chickens by Using a Retroviral Vector. **Journal of Virology**, v. 79, n. 17, p. 10864–10874, 2005.

KARP, Gerald. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3 ed. Barueri: Manole, 2005. 786p.

KOO, B. C.; KWON, M. S.; CHOI, B. R.; KIM, J. H.; CHO, S. K.; SOHN S. H.; CHO, E. J.; LEE, H. T.; CHANG, W.; JEON, I.; PARK, J. K.; PARK, J. B.; KIM, T. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. **The FASEB Journal**, v. 20, p.2251-2260, 2006.

KOST, A. K.; THEODORAKIS, N.; HUGHES, S. The nucleotide sequence of the chick cytoplasmatic β -actin gene. **Nucleic Acids Research**, v.11, n.23, 1983.

LEE, S. H.; GUPTA, M. K.; HAN, D. W.; HAN, S. Y.; UHM, S. J.; KIM, T.; LEE, H. T. Development of Transgenic Chickens Expressing Human Parathormone Under the Control of a Ubiquitous Promoter by Using a Retrovirus Vector System. **Poultry Science Association Inc.**, p.2221-2227, 2007.

LILLICO, S. G.; SHERMAN, A.; MCGREW, M. J.; ROBERTSON, C. D.; SMITH J.; HASLAM, C.; BARNARD, P.; RADCLIFFE, P. A.; MITROPHANOUS, K. A.; ELLIOT, E. A.; SANG, H. M. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. **PNAS**, v.104, n.6, p.1771-1776, 2007.

LIN, C.J.; BARBOSA, A.S. Técnicas de Análise da regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.4, p. 330-340, 2002.

LINDENMAIER, W.; NGUYEN-HUU, M. C., LURZ, R.; BLIN, N.; STRATMANN, M.; LAND, H.; JEEP, S.; SIPPEL, A. E.; SCHIITZ, G. Isolation and characterization of the chicken ovomucoid gene. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 5, 1979.

LODISH, Harvey et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054p.

MANZINI, S.; VARGIOLO, A.; STEHLE, I.M.; BACCI, M. L.; CERRITO, M.G.; GIOVANNONI, R.; ZANNONI, A. BIANCO, M.R.; FORNI, M.; DONINI, P.; PAPA, M., LIPPS, H.L.; LAVITRANO, M. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. **PNAS**, v.103, n. 47, p.17672:17677, 2006

MARKOWITZ, E.H.; GUREVICH, M.; SHORE, L.S.; KATZ, A.; STRAM, Y.; SHEMESH, M. Use of Sperm Plasmid DNA Lipofection Combined with REMI (Restriction Enzyme- Mediated Insertion) for Production of Transgenic Chickens Expressing eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) or Human Follicle-Stimulating Hormone. **Biology of Reproduction**. v.80, n.5, p.1046-1052, 2009.

MCGREW, M. J.; SHERMAN, A.; ELLARD, F. M.; LILLICO, S. G.; GILHOOLEY, H. J.; KINGSMAN, A. J.; MITROPHANOUS, K. A.; SANG, H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **European Molecular Biology Organization Reports**, v. 5, n. 7, p. 728-733, 2004.

MIRALLES, N. F.; ESPÍN, J. D.; CORCHERO, J. L.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Review: Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v.8, n.17, 2009.

MORSHED, M.; SANO, S.; NISHIMIYA, D.; ANDO, M.; NISHIMIYA, K.; IJIMA, S. Chicken Ovoalbumin promoter is Demethylated upon expressio in the regions specifically involved in estrogen-responsivess. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v.70, n.6, p.1438-1446, 2006.

pZsGreen1-1 Vector Information. Disponível em: <<http://www.clontech.com/images/pt/PT3815-5.pdf>> Acesso em 15 nov. 2009.

RUPA, P.; MINE, Y. Abalation of ovomucoid-induced allergic response by desensitization with recombinant ovomucoid third domain in a murine model. **Clinical and Experimental Immunology**, n.145, p.493-501, 2006.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; XAVIER,E.G.; ROLL, V.F.B; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.307-317, 2007.

SANJAY,G.;ORAN, A.O.; HON, H.; JACOB, J. The Hybrid Cytomegalovirus Enhancer/Chicken {beta}-Actin Promoter along with Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances the Protective Efficacy of DNA Vaccines. **The Journal of Immunology**, n.173, p.550-558, 2004.

TURNER, P.C. et al. **The Instant Notes in Molecular Biology**. BIOS Scientific Publischers, 1997. 307p.

YANG, P.; WANG, J.; GONG, G.; SUN, X.; ZHANG, R.; DU, Z.; LIU, Y.; LI, R.; DING, F.; TANG, B.; DAI, Y.; LI, N. Cattle Mammary Bioreactor Generated by a Novel Procedure of Transgenic Cloning for Large-Scale Production of Functional Human Lactoferrin. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.

YIN, X.J.; LEE, H.S.; YU, X.F.; CHOI, E.; KOO, B.C.; KWON, M.S.; LEE, Y.S.; CHO, S.J.; JIN, G.Z.; KIM, L.H.; SHIN, H.D.; KIM, T.; KIM, N.H.; KONG, K.I. Generation of Cloned Transgenic Cats Expressing Red Fluorescence Protein. **Biology of Reproduction**, n. 78, p.425–431, 2008.

WANG, J.; YANG, P.; TANG, B.; SUN, X.; ZHANG, R.; GUO, C.; GONG, G.; LIU, Y.; LI, R.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LI, N. Expression and Characterization of Bioactive Recombinant Human α -Lactalbumin in the Milk of Transgenic Cloned Cows. **Journal Dairy Science**. v. 91, p. 4466–4476, 2008.

ZAHA, Arnaldo, et al. **Biologia Molecular Básica**. 2 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000. 336p.