



CLONAGEM DO PROMOTOR OVOMUCÓIDE NO VETOR DE EXPRESSÃO EM EUCARIOTO *pZsGreen* PARA GERAÇÃO DE AVES TRANSGÊNICAS BIORREATORAS

SILVA, Evelise Sampaio; SIMIONATTO, Simone; GONÇALVES, Breno Xavier; CAMPOS, Vinicius Farias; COLLARES, Tiago; DESCHAMPS, João Carlos

Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal – EMTA
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas
Campus Universitário s/n Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
E-mail: esilva_ib@ufpel.edu.br
Web: www.ufpel.edu.br/cenbiot/emta

1. Introdução

A utilização de animais geneticamente modificados com o intuito de produzir proteínas de importância farmacológica em fluidos corporais surgiu na década de 80 com Hammer e colaboradores (COLLARES e SEIXAS, 2005). A expressão de proteínas terapêuticas utilizando as seqüências de regulação da síntese de polipeptídeos secretados por tecidos específicos já foi demonstrado em ovinos, caprinos, bovinos e frangos (LILLICO et al., 2007).

O uso de ovos de galinhas para a produção de biofármacos, apresenta vantagens como: baixo custo na manutenção dos animais (LEE et al., 2007), postura média de 330 ovos por animal/ano, riqueza protéica do ovo (COLLARES e SEIXAS, 2005) e glicosilação adequada das proteínas-alvo (BONGALHARDO, 2005). Sabe-se que o ovo da espécie *Gallus gallus* possui mais de 40 proteínas diferentes (CAMPOS et al., 2003). 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, ovomucóide, e ovotransferrina (Alleoni, 2006). Ovomucóide é uma glicoproteína que possui peso molecular de 26,1 kDa a 28,3 kDa (ALLEONI, 2006), termoestável (Rupa e Mine, 2006), com potencial alergênico, constituindo 11 % das proteínas do ovo. O direcionamento da expressão de genes de interesse para o oviduto de galinhas, utilizando a região promotora de ovomucóide é uma estratégia promissora para a produção de biofármacos. Este trabalho teve como objetivo a clonagem da seqüência promotora ovomucóide no vetor *pZsGreen*. Esta construção *pZsGreen/ovomucóide* promotor será avaliado quando ao direcionamento da expressão gênica para as células epiteliais do oviduto de *Gallus gallus* e conseqüentemente para os ovos.

2. Material e Métodos

Com base nas informações depositadas no banco de dados GenBank e com o auxílio do programa VectorNTI 9.0 (Invitrogen) foram desenhados primers para a sequência ovomucóide. Foi acrescentado ao *primer forward* e ao *reverse* sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, respectivamente. O DNA genômico foi extraído de sangue de *Gallus gallus* utilizando o Kit *Tissue & Cells genomicPrep Mini Spin* (GE-Healthcare) e a qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com GelRed (Bioscience). Na reação em cadeia da polimerase (PCR) a sequência promotora foi amplificada com temperatura de anelamento de 48°C.

O fragmento amplificado, de 618 pb foi analisado em gel de agarose 0,8 %, purificado através Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE-Healthcare) digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e purificados com o mesmo kit. Após, o fragmento foi ligado ao vetor de expressão pZsGreen (Clontech) (Figura 1) com o auxílio da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®), previamente digerido com as mesmas enzimas. Após transformação em *Escherichia coli* TOP10, os clones recombinantes foram identificados e cultivados em meio Luria Bertani (LB) líquido. O DNA plasmidial extraído destes clones foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para confirmação da presença do inserto.

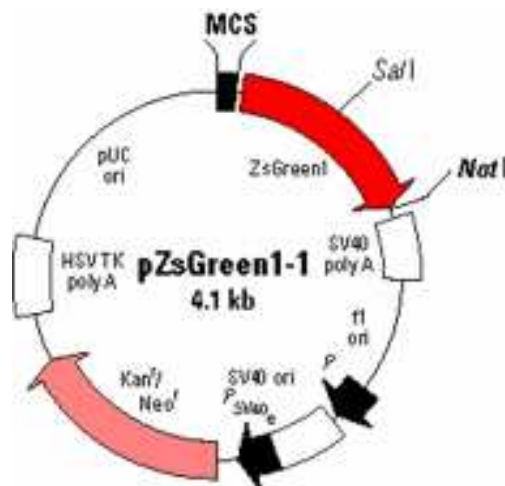


Figura 1: Desenho esquemático do vetor comercial *pZsGreen* (Clontech) que foi utilizado para clonagem de promotores gênicos de *Gallus gallus*.

3. Resultados e Discussão

A sequência promotora da ovoalbumina de 618 pb foi amplificada eficientemente por PCR conforme demonstrado na figura 1. Após serem cultivados em meio líquido, os plasmídios recombinantes foram extraídos e a presença do inserto foi confirmada através da digestão por enzimas de restrição. As digestões confirmaram a construção uma vez que foi liberado um fragmento de aproximadamente 618 pb e outro de aproximadamente 4,1 Kb referente ao fragmento ovomucóide e ao vetor pZsGreen, respectivamente.

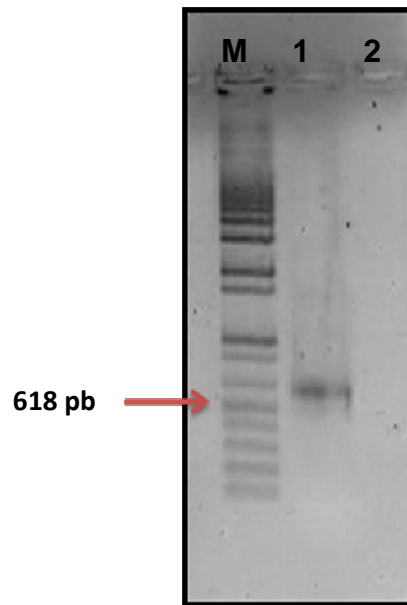


Figura 1. Gel de agarose 0,8 % corado com GelRed. Coluna M, marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen); coluna 1, sequência ovomucóide amplificada por PCR; coluna 2, controle negativo do PCR.

4. Conclusões

A região promotora ovomucóide foi clonada com sucesso no vetor de expressão em eucarioto pZsGreen. Esta construção pZsGreen/ovomucóide está sendo avaliada em um teste de expressão *in vitro* em cultura de células. Acredita-se que essa molécula recombinante permitirá o direcionamento da expressão ao oviduto de aves transgênicas, para a futura produção de biofármacos nos ovos desses animais..

5. Referências Bibliográficas

ALLEONI, Ana Claudia Carraro. Albumen Protein and Functional Properties of Gelation and Foaming **Science Agriculture**. v.63, n.3, p.291-298, 2006.

BONGALHADO, Denise Calisto. Produção de aves transgênicas. In: **Animais Transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. p. 209-236.

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** v.40(supl), p. 9-13, 2003.

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.

HIROSE, J.; DOI, Y.; KITABATAKE, N.; NARITA, H. Ovoalbum-Related Gene Y Protein Bears Carbohydrate Chains of the Ovomuroid type. **Bioscience Biotechnology, Biochemistry**, v.70 (1), p. 144-151, 2006.

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 (6), p. 1771–1776, 2007.

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