
Documentos

ISSN 0102-0110
Outubro, 2005 **145**

**PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS: METODOLOGIAS E
APLICAÇÕES.**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Documentos 145

PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS: METODOLOGIAS E APLICAÇÕES.

**Rodolfo Rumpf
Eduardo O. Melo**

Brasília, DF
2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

R 937 Rumpf, Rodolfo.

Produção de animais transgênicos: metodologias e aplicações / Rodolfo Rumpf, Eduardo O. Melo. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

27 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 – 0110; 145)

1. Animais transgênicos – produção. 2. Biofármacos – produção. 3. Bioprodutos – produção. 4. Xenotransplantes. I. Título. II. Melo, Eduardo O. III. Série.

636.0821 – CDD 21.

SUMÁRIO

1. Introdução	6
2. Metodologias.....	6
3. Aplicações.....	9
4. Produção de Biofármacos e Bioprodutos	9
5. Incremento de características de produção.....	10
6. Xenotransplante.....	13
7. Animais transgênicos como modelo para estudo de doenças humanas.....	15
8. Considerações e perspectivas	16
Referências Bibliográficas.....	19

1. Introdução

Os termos “Transgênico” e Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), estão muito em voga nos meios de comunicação nos dias de hoje e se referem, respectivamente, a organismos que por ação do homem tenham seqüências de DNA de outra espécie inseridas no seu genoma, ou que seu patrimônio genético tenha sofrido qualquer alteração engendrada e executada pelo intelecto humano. Entretanto, longe de ser uma novidade os OGMs são tão antigos quanto a própria tecnologia do DNA recombinante, tendo sua origem no início da década de 70 (COHEN et al., 1973; JACKSON et al., 1972). A modificação genética da bactéria *E. coli* foi um marco do início da Engenharia Genética há mais de 30 anos (COHEN et al., 1973), desde essa data até agora houve um extraordinário avanço das técnicas de manipulação genética e hoje podemos contar com uma enorme variedade de OGMs dentre bactérias, vermes, fungos, plantas e animais. Em relação à transgenia em animais, o camundongo pode ser considerado o grande marco, com os primeiros a serem modificados geneticamente em meados da década de 70 (JAENISCH et al., 1975). Até hoje os camundongos são os principais modelos de estudo genético em mamíferos, sendo que seu genoma já encontra-se inteiramente sequenciado (WATERSTON et al., 2002). A partir dos avanços obtidos com camundongos, foram surgindo a uma velocidade surpreendente cada vez mais relatos sobre modificações genéticas em animais de produção como bovinos, suínos, ovinos e caprinos (Tabela 1). Tais modificações surgiram, em primeira instância, com o objetivo de se usar esses animais como biofábricas para produzir, em larga escala e a baixo custo, substâncias com princípios farmacológicos de alto valor no mercado internacional. Com o desenvolvimento da técnica de transferência nuclear a partir de células somáticas de mamíferos (WILMUT et al., 1997), a ovelha Dolly foi gerada abrindo uma nova era de perspectivas em relação às possibilidades de modificação genética em animais de produção com precisão e redução de custo nunca antes alcançada (POLEJAEVA e CAMPBELL, 2000). A partir do nascimento da ovelha Dolly, uma nova onda de interesse em relação à transgenia animal colocou em um plano mais elevado as propostas de modificações genéticas objetivando o aumento quantitativo e qualitativo da produção animal. Nosso objetivo neste trabalho é apresentar uma visão atual dos avanços nas técnicas de transformação genética em animais de produção e suas aplicações mais relevantes.

2. Metodologias

A primeira transferência de DNA exógeno (transgene) para um mamífero, com posterior transmissão do transgene para a geração seguinte foi obtida através da infecção de embriões de camundongo com o retrovírus transmissor da leucemia (JAENISCH et al., 1975). Retrovírus são vírus que possuem RNA como material genético e ao infectarem células de mamíferos têm seu material genético convertido em DNA e integrado no genoma da célula hospedeira. Os retrovírus são uma eficiente forma de transferência de material genético, sendo usados para infectar embriões bovinos através de sua injeção no espaço perivitelínico entre a zona pelúcida e a membrana do ovócito posteriormente fecundado *in vitro* (CHAN et al., 1998). Entretanto, a transferência de DNA por retrovírus possui limitações pelo fato dos retrovírus infectarem preferencialmente células em divisão, pelo alto índice de formação de animais quiméricos incapazes de transmitir o transgene para sua prole e pelo fato dos retrovírus serem responsáveis por importantes doenças como anemia infecciosa eqüina (AIEV), imunodeficiência em humanos (HIV) (CLARK e WHITELAW, 2003). Mesmo sendo manipulados geneticamente para não se propagarem

ou causarem doenças aos organismos hospedeiros, ainda existem muitas restrições ao uso de tais vetores para produção de animais transgênicos de produção.

A transgenia em mamíferos feita por meio da fecundação de ovócitos de coelho com esperma incubado com DNA exógeno remonta o início da década de 70 (BRACKETT et al., 1971). Entretanto o organismo gerado era um mosaico incapaz de transmitir o transgene à sua prole. A transferência de DNA mediada por esperma pode ser realizada tanto na produção *in vitro* de embriões quanto na inseminação artificial (MAIONE et al., 1998). Entretanto a maior desvantagem da transgenia mediada por esperma incubado com DNA reside no fato da baixa taxa de incorporação do DNA exógeno ao genoma hospedeiro. Para se aumentar a eficiência é possível submeter os espermatozoides a eletroporação, porém este tratamento altera a maquinaria celular e compromete a fecundação propriamente dita. Uma alternativa seria então utilizar a técnica de injeção intra-citoplasmática de espermatozoides que em bovinos ainda esta em desenvolvimento.

Uma variante da técnica de transferência de DNA por meio de esperma, é a geração de células tronco germinativas masculinas transformadas de maneira estável com DNA e transplantadas para as gônadas masculinas de camundongo (NAGANO et al., 2001). Posteriormente, essa técnica foi reproduzida em suínos e caprinos (HONARAMOOZ et al., 2002; HONARAMOOZ et al., 2003) gerando animais capazes de produzir esperma contendo o transgene. Com essa técnica é possível gerar linhagens de animais que possuam uma proporção em torno de 5% de espermatozoides transgênicos de maneira constitutiva (NAGANO et al., 2001). A transgenia por meio de transformação de células troncos embrionárias é uma metodologia muito promissora dentre as espécies em que a manipulação *in vitro* das células tronco germinativas é factível.

De forma similar à metodologia de transgênese por meio de células tronco germinativas, a geração de quimeras transgênicas por meio da transferência de DNA para células tronco embrionárias e posterior injeção dessas células para o interior da blastocle de blastocistos em desenvolvimento é factível em animais para os quais existe a possibilidade de manipulação *in vitro* de tais tipos celulares (ROBERTSON et al., 1986). As células tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna de embriões na fase de blastocisto e são consideradas multipotentes, pois são capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular de um indivíduo. Tais células foram isoladas e cultivadas primeiramente a partir de camundongos (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981) e sua grande utilidade na transgenia animal encontra-se no fato de se poder cultivar e selecionar linhagens clonais contendo inserções de DNA por recombinação homóloga, possibilitando o “knock-out” de genes ou inserção de variantes alélicas muito importantes para o estudo sobre função de genes de interesse humano (CAPECCHI, 1989; THOMAS e CAPECCHI, 1987). Uma das limitações dessa técnica para produção de animais de produção reside no fato de que as quimeras produzidas terem que ser submetidas a uma série de cruzamentos, até que se produzam indivíduos com o transgene presente em todos seus tipos celulares. Outra limitação reside no fato de que o isolamento e estabelecimento do cultivo *in vitro* de células tronco embrionárias de animais de produção, como suínos e bovinos, ainda é uma técnica incipiente em que a validação da multipotência das células tronco isoladas aguarda confirmação (SAITO et al., 2003; SHIM et al., 1997).

Outro método de introdução de genes exógenos em animais é a injeção pronuclear, que envolve a introdução direta do DNA exógeno em um dos pró-núcleos formados na etapa inicial da fecundação do ovócito. O embrião injetado permanece em cultivo *in vitro* até ser transferido para receptoras sincronizadas. Essa técnica foi desenvolvida primeiramente em camundongos (GORDON e RUDDLE, 1981; PALMITER et al., 1982). A injeção pronuclear foi posteriormente responsável pela primeira tentativa bem sucedida de transgenia em animais de produção como coelhos, ovelhas e suínos contendo o gene do hormônio do crescimento humano (HAMMER et al., 1985). Também

foi por meio desta técnica que surgiu Herman, o primeiro bovino transgênico contendo o gene da lactoferrina humana (KRIMPENFORT et al., 1991). Até os dias de hoje a injeção pronuclear é uma metodologia amplamente usada e bem sucedida de produção de animais transgênicos. Entretanto, essa técnica possui sérias restrições tais como: 1) a impossibilidade de produzir “knock-outs” por recombinação homóloga; 2) baixa eficiência na geração de embriões em que o DNA injetado foi incorporado no genoma hospedeiro (NOTTLE et al., 2001); 3) produção de embriões quiméricos para inserção do transgene que originarão indivíduos mosaicos com parte das suas células contendo o transgene e parte não, o que requer uma fase posterior de cruzamentos para transmitir o transgene de forma uniforme para a prole (KEEFER, 2004); 4) pouca eficiência na expressão do gene introduzido devido ao efeito de posição, quando o gene inserido aleatoriamente sofre efeito negativo dos elementos regulatórios circundantes ou encontra-se em região de heterocromatina (CLARK et al., 1994). Devido aos baixos índices desta técnica, cerca de 1000 ovócitos de bovino, ou 300 de ovelha e 200 de cabra devem ser micro-injetados para produzir um animal transgênico fundador (SEIDEL JUNIOR, 1993).

Recentemente o sucesso da primeira transferência nuclear (TN) a partir de células somáticas de ovelha gerou a Dolly, o primeiro animal clonado a partir de células adultas diferenciadas da glândula mamária (WILMUT et al., 1997). Essa técnica consiste na remoção micro-cirúrgica do DNA (enucleação) do ovócito maturado que se encontra na fase MII da meiose, produzindo o citoplasto (doador do citoplasma). Em seguida uma célula doadora de núcleo, que a princípio pode ser qualquer célula de um indivíduo, é colocada no espaço perivitelínico (espaço formado entre a zona pelúcida e a membrana citoplasmática) do citoplasto e submetido a pulsos elétricos que promoverão a fusão da célula doadora do material genético com o citoplasto. Após a fusão, o citoplasto reconstruído é ativado quimicamente ou fisicamente para que se inicie o processo de desenvolvimento embrionário. Se a reconstrução e reprogramação do núcleo doado (que é feita pelo citoplasto) forem bem sucedidas, um embrião será produzido *in vitro* e posteriormente transferido para uma fêmea receptora (CAMPBELL et al., 1996; WILMUT et al., 1997). Esse processo também é conhecido como clonagem, já que uma série de indivíduos geneticamente idênticos (clones) pode ser produzida a partir de uma única linhagem doadora de DNA. O fato das células doadoras do material genético poderem ser cultivadas *in vitro* por dezenas de gerações antes de serem fusionadas ao citoplasto sem haver perda na eficiência da produção de embriões clones (KASINATHAN et al., 2001a), torna possível a manipulação genética de tais células *in vitro* antes da TN. Com isso é possível transfectar as células doadoras cultivadas *in vitro*, selecionar a integração do DNA exógeno no genoma e isolar linhagens celulares a partir de uma única célula onde o transgene foi incorporado. Esse processo deu origem ao primeiro animal de produção (ovelha) contendo o gene humano do fator IX de coagulação (SCHNIEKE et al., 1997); logo em seguida foram produzidos 5 clones bovinos transgênicos contendo o gene de resistência ao antibiótico G418 (CIBELLI et al., 1998). Muitos outros animais transgênicos foram produzidos por TN desde então (KEEFER, 2004; KUES e NIEMANN, 2004). Uma grande vantagem da produção de transgênicos por TN em relação à micro-injeção pronuclear é a possibilidade de se produzir “knock-out” gênicos e substituições alélicas por recombinação homóloga entre o DNA exógeno e o DNA genômico das células doadoras (MCCREATH et al., 2000). Mesmo sendo uma técnica nova e ainda apresentando baixos índices de produção de animais clones (em torno de 1% do número de citoplastos reconstruídos), a possibilidade de seleção das células doadoras antes da TN permite a produção de embriões transgênicos sem o risco de formação de quimeras e com a confiança quase absoluta que os embriões obtidos serão transgênicos. Isso reduz em muito os custos e o tempo de produção de animais transgênicos em relação as demais metodologias (POLEJAEVA e CAMPBELL, 2000). Todavia recentes trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de incrementar os índices de produção de

clones por TN, dentre eles destacam-se o uso de fibroblastos sincronizados na fase G1 do ciclo celular como doadores de núcleo (GIBBONS et al., 2002; KASINATHAN et al., 2001b) e a pré-reprogramação dos fibroblastos doadores de núcleo através de sua permeabilização com extratos de células em mitose (SULLIVAN et al., 2004). Pelos fatores citados acima, a TN é hoje a metodologia mais promissora na obtenção de animais de produção transgênicos.

3. Aplicações

Desde os primeiros relatos publicados sobre obtenção de animais transgênicos no final da década de 70 e início da década de 80, uma enorme variedade de aplicações para transgenia em animais de produção foi vislumbrada e sugerida. Muitas dessas aplicações permanecem no papel a espera de cientistas e empreendedores que concretizem tais desafios, muitos dos quais provavelmente nunca serão realizados. Entretanto, vários empreendimentos foram iniciados e hoje temos a real perspectiva de, muito em breve, contarmos com produtos oriundos da tecnologia de transgenia animal no mercado de consumo. Nos parágrafos seguintes iremos citar alguns exemplos de animais transgênicos que estão sendo produzidos com perspectivas concretas de aplicação na cadeia de produção, ou algumas possibilidades que estão próximas a dar origem a novos animais transgênicos dentre caprinos, ovinos, bovinos e suínos.

4. Produção de Biofármacos e Bioprodutos

Devido ao seu elevado custo, a produção de animais transgênicos de grande porte como suínos, caprinos, ovinos e bovinos só é economicamente viável se o produto final tiver um alto valor de mercado. Por essa razão a produção de substâncias de interesse para a indústria farmacêutica (biofármacos), que compreende um mercado de bilhões de dólares (MILLER, 2002; WALL et al., 1997), é o principal e mais promissor filão do mercado de animais transgênicos (Tabela 2). Muitas empresas de biotecnologia, cujo principal foco é a produção de animais transgênicos que proporcione a síntese de biofármacos com alto valor agregado, surgiram na última década, entre elas podemos citar: PPL Therapeutics (RU), GTC Biotherapeutics (EUA), Hematech (EUA), Nexia Biotechnologies (Canadá), Pharming (Holanda), BioProtein Technologies (França), Avigenics (EUA), Viragen (EUA), TranXenoGen (EUA). A produção de biofármacos pode ser direcionada via promotores tecido-específicos para vários fluidos biológicos como urina, plasma sanguíneo e fluido seminal (DYCK et al., 2003). Entretanto, devido ao seu alto volume de produção, o leite é o meio de produção preferencialmente utilizado pelos trabalhos realizados com animais transgênicos. Ao direcionar a síntese do biofármaco para as células da glândula mamária é possível obter > 2g de produto por litro de leite (VAN BERKEL et al., 2002; VELANDER et al., 1992). Baseado nesse pressuposto, no volume médio diário de produção de leite e numa estimativa de eficiência de purificação da proteína de interesse, pode-se inferir que seriam necessárias 5.400 vacas para produzir os 10.000 kg de albumina sérica humana (demanda mundial atual), ou 4.500 ovelhas para produzir 5.000 kg de α -antitripsina, 100 cabras para produzir 100 kg de anticorpos monoclonais, 75 cabras para produzir 75 kg de anti-trombina III e dois suínos para produzir 2 kg de fator de coagulação IX humano (RUDOLPH, 1999). Portanto um número relativamente pequeno de animais poderia suprir toda uma demanda mundial de biomoléculas, que devido a sua alta complexidade, não podem ser sintetizadas por bioreatores baseados em bactérias ou leveduras.

Alguns desses biofármacos encontram-se em fase final de testes clínicos ou regulamentação junto às agências de saúde, entre eles podemos citar: 1) produção de antitrombina III em cabra (GTC Biotherapeutics), a antitrombina III é um agente

coagulante direcionado ao tratamento de pacientes com resistência genética a heparina; 2) produção de anticorpos policlonais humanos em vacas para vacinação em massa (Hematech); 3) produção de albumina sérica humana (HSA) em vaca (GTC Biotherapeutics): a HSA é um hemoderivado de alto valor no mercado; 4) produção de α -antitripsina em ovelhas (PPL) para o tratamento de efisema pulmonar e alívio de sintomas da fibrose cística; 5) produção de fator de coagulação IX em ovelhas (PPL) e fator VIII em suínos (PALEYANDA et al., 1997) para tratamento de hemofilia-A; 6) produção de lactoferrina humana em vacas (Pharming): a lactoferrina possui propriedades antibacteriana, anti-fúngica, anti-viral, além de ser um estimuladora natural da defesa inata contra patógenos. Contudo, nem todas as iniciativas de se produzir biofármacos no leite de animais foram bem sucedidas. Em muitos casos, a proteína sintetizada no leite produzia efeitos colaterais como por exemplo: 1) efeito da eritropoetina causando problemas na hematopoiese e fertilidade de coelhos (MASSOUD et al., 1996); 2) término prematuro da lactação em cabras expressando o ativador plasminogênico de tecido humano (TPA) (EBERT et al., 1994); 3) baixa produção do fator de coagulação VIII em ovelhas devido a sua imobilização no leite (NIEMANN et al., 1999), embora esse efeito indesejado pareça não ter sido observado na produção do mesmo fator em suínos (PALEYANDA et al., 1997).

A obtenção de um animal transgênico capaz de transmitir o transgene a seus descendentes, que expresse corretamente a molécula de interesse numa concentração (> 1 mg/ml) compatível para que o investimento de tempo e dinheiro seja comercialmente viável (WALL et al., 1997), é um grande desafio que demanda muito conhecimento, tempo e trabalho. Entretanto, após se atingir esse valoroso objetivo ainda há outro desafio tão grande quanto à própria produção da proteína recombinante, que é o processo de purificação dessa proteína que se encontra diluída dentre centenas de outras proteínas componentes do leite. Com a intenção de clonar animais capazes de produzir fibras da teia de aranha no leite, genes que codificam tais proteínas foram expressos em células epiteliais de glândula mamária e, posteriormente, as proteínas recombinantes foram purificadas e submetidas à formação de uma fibra (LAZARIS et al., 2002). No entanto, a fibra produzida não atingiu todas as propriedades de tenacidade e resistência apresentadas pela fibra da teia de aranha natural. Portanto a purificação da proteína pode ser uma etapa onerosa e crítica do ponto de vista da viabilidade comercial do produto desejado.

5. Incremento de características de produção

A possibilidade de uso da transgenia como instrumento para obter maior ganho em produtividade é tão antigo quanto o surgimento dos primeiros camundongos super-desenvolvidos devido a ação do hormônio do crescimento humano (PALMITER et al., 1982), mas os elevados lucros estimados inicialmente com a comercialização de biofármacos produzidos por animais transgênicos priorizaram essa linha de investigação e geração de produtos. Entretanto o recente “boom” de empresas de biotecnologia que surgiram na última década visando a produção de um número limitado de biomoléculas, juntamente com os enormes custos para se colocar um biofármaco no mercado, tornam esse filão de negócios cada dia mais competitivo e menos lucrativo. Diante desse panorama desfavorável a PPL Therapeutics, a empresa por trás do trabalho que gerou a ovelha Dolly e detentora de boa parte dos animais transgênicos produtores de biofármacos no leite (Tabela 2), declarou falência em 2004 devido a dificuldades financeiras e falta de investimentos (www.onescience.com/forum/). Para se ter uma idéia, o FDA (departamento que regulamenta a venda de alimentos e medicamentos nos EUA) exige uma série de testes clínicos, laboratoriais e ambientais, além de cobrança de inúmeras taxas, que elevam para cerca de U\$800 milhões o custo para se colocar um

biofármaco no mercado americano e, atualmente, tal processo leva em média 15 anos, entre o início das pesquisas e a comercialização do produto final (MILLER, 2002). A crescente competição e complexa regulamentação do mercado de biofármacos, juntamente com os recentes avanços nas técnicas de obtenção de animais transgênicos, permitindo uma significativa redução nos custos de produção, deram nos últimos anos um novo fôlego ao interesse por pesquisas com animais transgênicos visando aumento da produção. Isso gerou uma diversificada gama de ações visando à obtenção de ganho na qualidade da carne e carcaça, aumento na produção de leite, modificação da composição do leite, aumento da prolificidade, produção de animais resistentes a doenças, alteração da composição da lã, entre outras características com potencial interesse econômico.

O leite é um fluido biológico complexo de fundamental importância na dieta da população de vários países. Sua produção anual supera a casa dos 400×10^9 litros e sua comercialização movimentada cerca de 400 bilhões de dólares no mercado mundial (KARATZAS, 2003). A família das caseínas constitui a maior parte (cerca de 80%) dos componentes protéicos do leite, sendo constituída pelas caseínas α S1, α S2, β e κ que por sua vez são codificadas por genes de cópia única no genoma dos mamíferos (KARATZAS e TURNER, 1997). As caseínas se agrupam em grandes micelas e a mudança na proporção de cada tipo de caseínas leva a alterações nas propriedades de estrutura e estabilidade das micelas e, conseqüentemente, nas características fisicoquímicas do leite. O queijo é formado pela agregação das micelas de caseína em redes protéicas capazes de reter água e boa parte da gordura do leite, sendo que o aumento de k-caseína na constituição do leite está associado a redução do tamanho das micelas e ao incremento da sua estabilidade térmica que são propriedades de grande importância para indústria de laticínios (KANG et al., 1986). Recentemente foram gerados bovinos transgênicos contendo cópias extras do genes CSN2 e CSN3 que codificam as caseínas bovinas α e β , respectivamente (BROPHY et al., 2003). Esse incremento no número de cópias dos genes resultou em um aumento entre 8% a 20% na quantidade de α -caseína e dobrou a quantidade de β -caseína do leite dos animais transgênicos. Esses resultados têm um impacto direto na perspectiva de aumento de eficiência da produção de queijo que movimentada um mercado de dezenas de bilhões de dólares.

Outros constituintes do leite são alvos interessantes para serem alterados geneticamente. Cerca de 70% da população mundial, principalmente os indivíduos de origem asiática, possui deficiência da enzima lactase responsável pela digestão da lactose (principal açúcar do leite), o que limita o potencial de consumo de leite. Uma estratégia para se solucionar essa limitação seria deleção dos genes que participam na via de síntese da lactose. Em 1995 foi publicado um artigo em que o gene da α -lactoalbumina foi removido de camundongos. Essa proteína faz parte do complexo de síntese de lactose e a remoção de um de seus alelos reduziu em 20% a quantidade de lactose do leite (STACEY et al., 1995; STINNAKRE et al., 1994). Entretanto a remoção do segundo alelo do gene, apesar de reduzir a zero a quantidade de lactose, levou também a uma profunda alteração nas propriedades fisicoquímicas do leite que se apresentou muito viscoso e em reduzida quantidade, o que desmotivou a continuidade das pesquisas com esse tipo de abordagem. Não obstante a esses resultados, o interesse econômico em se produzir leite com baixo índice de lactose mantém viva a esperança de se obter esse produto através de outras estratégias, tais como produzir animais contendo o gene que codifica a enzima lactase, responsável pela degradação da lactose (JOST et al., 1999). O aumento na produção de leite também é uma meta a ser alcançada, devido à intensa pressão seletiva para se obter menor período de lactação e melhor desfrute da leitegada por matriz/ano. As matrizes passaram a apresentar uma menor capacidade de nutrir seus leitões devido ao curto período de lactação, o que provoca um efeito indesejado no que se refere ao ganho de peso da leitegada refletido, não apenas na fase inicial, mas que persiste durante toda a fase de crescimento até o abate (WHEELER, 2003). Nesse

aspecto mais uma vez a α -lactoalbumina aparece como foco de interesse. Isso pelo fato de que o aumento na síntese de α -lactoalbumina está diretamente relacionado ao o aumento da produção de leite. Com o objetivo de aumentar a produção de leite das matrizes, cópias dos genes que codificam a α -lactoalbumina bovina foram introduzidas em suínos (BLECK et al., 1998). Essa abordagem provocou um aumento significativo na produção de leite durante os 9 primeiros dias de lactação das matrizes transgênicas comparado às não transgênicas, levando também a um aumento na taxa de crescimento da ninhada amamentada pelas matrizes transgênicas (NOBLE et al., 2002). Esse efeito pode significar um ganho de milhões de dólares no mercado de suinocultura.

A aplicação da transgenia para se obter animais com modificações nas propriedades do leite não está apenas relacionado com a indústria de laticínios. A “humanização” do leite de animais como bovinos e caprinos pode trazer inúmeros benefícios à saúde humana como, por exemplo, a expressão da lactoferrina humana no leite. A lactoferrina possui propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (HASEGAWA et al., 1994; NIBBERING et al., 2001; SOUKKA et al., 1992). Não obstante, ela é capaz de estimular o crescimento de bactérias da biota intestinal de crianças saudáveis amamentadas com leite materno e estimular o crescimento de células intestinais *in vitro* (NUIJENS et al., 1997). A obtenção de quatro vacas capazes de produzir até 2 mg/ml de lactoferrina humana no leite é um feito muito promissor na melhora da imunidade inata de crianças (VAN BERKEL et al., 2002). Outro grande mercado para aplicação da transgenia em animais de produção é o da resistência a doenças. A mastite é uma inflamação da glândula mamária de vacas em lactação causada principalmente por cinco espécies de bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus galactiae* e *Escherichia coli*. Entretanto a *Staphylococcus aureus* é a responsável pela maioria dos casos além de ser a de mais difícil controle devido a sua resistência a vários antibióticos (KERR e WELLNITZ, 2003). A mastite é a doença de maior impacto econômico em rebanhos de gado leiteiro, estimando-se um prejuízo anual provocado por esta doença de aproximadamente 1,7 bilhões de dólares só nos EUA (KERR e WELLNITZ, 2003). A lisostafina é uma potente hidrolase de peptídeoglicano secretada naturalmente pela bactéria *Staphylococcus simulans*, possuindo um efeito bactericida específico contra outras *Staphylococcus*, como a *S. aureus*. A eficácia do efeito protetor conferido pela lisostafina contra a infecção das células da glândula mamária por *S. aureus*, foi demonstrada com camundongos transgênicos que expressavam a lisostafina na células da glândula mamária (KERR et al., 2001). Recentemente, o mesmo grupo obteve vacas transgênicas capazes de expressar até 14 mg/ml de lisostafina no leite (WALL et al., 2005). Nesse estudo infusões de *S. aureus* foram feitas nas glândulas mamárias de três vacas transgênicas e dez não-transgênicas, enquanto nenhum dos animais transgênicos apresentou sintomas de mastite, todos os dez animais não-transgênicos desenvolveram os sintomas da doença. Outra doença bovina que assola muitos países do hemisfério norte é a encefalopatia espongiforme bovina (“bovine spongiform encephalopathie” - BSE), vulgarmente conhecida como doença da vaca louca, que causou prejuízos de milhões de dólares com o sacrifício de milhares de animais no Reino Unido (DETWILER e RUBENSTEIN, 2000). A provável causa da BSE encontra-se numa mutação de uma proteína chamada príon (PrP^C), normalmente encontrada na superfície dos neurônios, que gera uma forma defeituosa da PrP (PrP^{Sc}) capaz de “infectar” animais sadios que se alimentam com ração produzida com subprodutos de origem animal, provocando a BSE (WEISSMANN et al., 2002). No início da década de 90 foi gerado um camundongo transgênico com o gene PrP^C deletado (BUELER et al., 1992), esse camundongo tinha o desenvolvimento normal e apresentava-se resistente a encefalopatia mesmo ao ser inoculado com príons na forma infectiva (BUELER et al., 1993). Posteriormente, foram gerados ovelhas e bovinos transgênicos que tiveram o gene PrP^C removido (DENNING et

al., 2001; KUROIWA et al., 2004), abrindo-se a perspectiva que tais animais sejam também resistentes a BSE. Vale destacar que além da deleção do gene PrP^C, as ovelhas e bovinos produzidos tinham uma segunda manipulação genética elaborada para a remoção de genes envolvidos com rejeição de transplantes (DENNING et al., 2001), ou remoção dos genes responsáveis pela produção de imunoglobulinas, visando com isso a produção de imunoglobulina humana em bovinos (KUROIWA et al., 2004). A brucelose é outra doença muito importante na sanidade bovina em todo mundo, no entanto já foram identificados animais naturalmente resistentes a brucela. Essa resistência foi rastreada e correlacionada à presença de uma variante do gene NRAMP1 em bovinos. Esse gene foi recentemente introduzido em linhagens de macrófagos de camundongos com o objetivo de se avaliar seu efeito protetor durante a infecção com brucela (BARTHEL et al., 2001). Isso abre uma promissora perspectiva de introdução do alelo do gene NRAMP1 que confere resistência à brucela em várias raças de bovinos.

O aumento no rendimento de carcaça e produção de carne também é um foco da transgenia em animais de produção. Um exemplo pioneiro foi a produção de camundongos que expressavam o gene do hormônio do crescimento humano e apresentavam um aumento dramático na taxa de desenvolvimento e tamanho corporal (PALMITER et al., 1982). Entretanto, suínos transgênicos que expressavam o mesmo gene possuíam apenas um aumento moderado no crescimento além de apresentar efeitos colaterais indesejados como perda na fertilidade, susceptibilidade ao estresse, alta incidência de úlceras, artrite, dermatites e doença renal (PURSEL et al., 1989). De outro lado mutações encontradas no gene da miostatina (GDF-8) foram correlacionadas com o fenótipo de musculatura dupla observado em raças européias de bovinos como “Belgian Blue” e “Piedmontese” (GROBET et al., 1997; MCPHERRON e LEE, 1997). A miostatina é um inibidor do crescimento muscular em mamíferos e sua ausência provoca hiperplasia e hipertrofia da musculatura esquelética. Camundongos transgênicos em que o gene da miostatina foi removido, também apresentaram o mesmo fenótipo de musculatura dupla observado em bovinos (MCPHERRON et al., 1997), apresentando um crescimento muscular duas a três vezes maior do que camundongos normais. Esse trabalho abre a perspectiva de se obter por transgenia outros animais com esse fenótipo, já que o gene da miostatina apresenta-se conservado entre todos os mamíferos.

Inúmeras outras aplicações da transgenia podem ser vislumbradas em relação a características como prolificidade, já que existem raças de ovelhas que apresentam ovulação múltipla devido ao efeito de mutações em genes envolvidos na regulação do desenvolvimento e crescimento folicular como GDF9, BMP15 e ALK6/BMPRI1B (HANRAHAN et al., 2004; JUENGEL et al., 2002; SOUZA et al., 2001). Também há a possibilidade de produção de touros contendo genes “suicidas” capazes de produzir apenas espermatozóides desprovidos do cromossomo Y, ou ovelhas que apresentem um aumento na qualidade e produção de lã (POWELL et al., 1994), ou ainda suínos ecologicamente corretos que expressam o gene da fitase bacteriana na saliva e com isso são capazes de digerir o fitato dos alimentos e, portanto, excretam 75% menos fitato fosfórico (maior fonte de poluente fosfórico da suinocultura) em suas fezes (GOLOVAN et al., 2001). Muitas aplicações da transgenia em animais de produção vêm sendo exploradas nos últimos anos e muitas outras poderão estar no nosso dia-dia em breve.

6. Xenotransplante

Hoje, por volta de 250.000 pessoas são beneficiárias de algum tipo de transplante de órgão (alotransplante) bem sucedido no mundo. Cerca de 75% a 90% dos transplantados sobrevivem ao primeiro ano pós-transplante, com uma sobrevida média de

10 a 15 anos para transplantes de coração, fígado e rim (KUES e NIEMANN, 2004). Entretanto, a disponibilidade de doadores de órgãos é sempre deficitária em relação aos pacientes que precisam de algum tipo de transplante. No Brasil o Sistema Nacional de Transplantes (criado em 1997) já realizou mais de 60.000 transplantes em todo território nacional em seus sete anos de existência. Entretanto, a fila de espera supera a marca de 63.000 pacientes que precisam ser atendidos o mais breve possível (<http://dtr2001.saude.gov.br/transplantes>). Nos EUA, a fila supera 88.000 pacientes numa proporção de 1:4 entre doadores e pacientes (<http://www.unos.org>). Esses dados demonstram a necessidade proeminente de se buscar alternativas como fonte de órgãos. Nesse sentido, foram feitas há décadas as primeiras propostas factíveis de se transplantar órgãos de espécies que não a humana (Xenotransplante) para se reduzir o déficit de órgãos no mundo, sendo que as primeiras tentativas de transplante envolveram o transplante de rim de chimpanzé para humanos em 1963 (para revisão (AUCHINCLOSS e SACHS JUNIOR, 1998). Atualmente, o animal mais estudado em pesquisas de xenotransplante é o suíno doméstico, os motivos dessa escolha se devem: 1) seus órgãos possuem tamanho, fisiologia e anatomia similar aos de humanos; 2) os suínos crescem rapidamente, atingindo sua maturidade em um curto espaço de tempo; 3) são altamente prolíficos; 4) podem ser mantidos em ambientes assépticos a um custo relativamente baixo; 5) técnicas de transgênese para alterar a imunogenicidade de suínos estão estabelecidas. Os maiores obstáculos imunológicos para prática de xenotransplante encontram-se na rejeição hiper-aguda (“hyperacute rejection response” - HAR) que acontece dentro de segundos ou minutos, na rejeição vascular aguda (“acute vascular rejection” - AVR) que ocorre dentro de dias e na rejeição celular que se manifesta após semanas (AUCHINCLOSS e SACHS JUNIOR, 1998). Uma das tentativas de evitar a resposta humoral que ativa a cascata do complemento que é ativada pelo complexo anticorpo-antígeno, levando a HAR e AVR, é a produção de suínos transgênicos que expressam proteínas humanas inibidoras da cascata do complemento como os fatores hCD59 (FODOR et al., 1994), hCD46 (DIAMOND et al., 2001) e hDAF (ZAIDI et al., 1998). Nesses experimentos, foi conseguida uma sobrevivência de 23 dias de primatas não-humanos transplantados com coração de suínos transgênicos (DIAMOND et al., 2001). Outra estratégia promissora para se evitar a HAR é a remoção de estruturas antigênicas presentes nas superfícies dos órgãos a serem transplantados, uma das principais estruturas são os epítomos contendo o glicídio 1,3- α -galactose (ausente em humanos). Com o objetivo de remover tais estruturas foram gerados, por recombinação homóloga, suínos transgênicos desprovidos dos dois alelos responsáveis pela expressão da enzima 1,3- α -galactosiltransferase, responsável pela adição da 1,3- α -galactose às cadeias de polissacarídeos antigênicos (PHELPS et al., 2003). Xenotransplantes utilizando células transgênicas de bovino foram utilizadas com sucesso para amenizar sintomas do mal de Parkinson em modelos experimentais como camundongos (ZAWADA et al., 1998) e avanços também foram obtidos com células transgênicas de suínos para regenerar lesões da medula em camundongos (IMAIZUMI et al., 2000). Entretanto, a transmissão de zoonoses é uma grande preocupação que norteia os estudos com xenotransplantes. Em 1997 foi documentado que células de suínos portadoras do retrovírus PERV, cultivadas *in vitro*, poderiam infectar células humanas em cultivo (PATIENCE et al., 1997). Porém, estudos posteriores não foram capazes de identificar a presença do PERV em centenas de pacientes que receberam transplantes com células de suínos num período de até 12 anos (PARADIS et al., 1999; PATIENCE et al., 1998). Com os recentes e promissores avanços das pesquisas sobre células-tronco (para uma revisão recente sobre o assunto consultar (WOBUS e BOHELER, 2005)), o uso dessa tecnologia em terapias regenerativas vem ganhando muita atenção da comunidade científica e da população em geral, sendo que seu sucesso e aceitação poderão diminuir o interesse em relação às pesquisas com xenotransplantes.

7. Animais transgênicos como modelo para estudo de doenças humanas

Existem na espécie humana cerca de 35.000 genes que formam a base de toda informação que permite a formação e manutenção do nosso organismo (LANDER et al. 2001). Até o presente momento já foram caracterizadas cerca de 6.000 doenças humanas fundamentadas na herança genética mendeliana (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>). Muitas dessas doenças são decorrentes de mutações gênicas já caracterizadas e passíveis de serem reproduzidas em camundongos através da deleção dos genes correspondentes por recombinação homóloga (“Knock-out”). Tais animais servem como um valioso modelo experimental de estudo sobre os sintomas e causas de doenças observadas em humanos, como por exemplo, no estudo do câncer (MARX, 2003). Entretanto muitos aspectos da anatomia, fisiologia e tempo de vida dos camundongos diferem significativamente dos humanos. Portanto, para muitas doenças, o estudo de camundongos como modelo genético possui limitações que podem ser contornadas usando-se animais como suínos, ovinos, ou bovinos como modelo de estudo. Um exemplo pioneiro do uso de suínos transgênicos como modelo de estudo, foi o uso de animais que tiveram o gene da rodopsina alterado para mimetizar uma mutação no gene humano que leva a retinite pigmentosa. Essa doença é responsável pela cegueira noturna e o mesmo fenótipo foi observado nos animais transgênicos (PETTERS et al., 1997). Em suínos também foi desenvolvido um modelo de estudo sobre o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH). A alteração do GHRH é detectada em pacientes como síndrome de Turner, doença de Crohn, insuficiência renal, retardo do crescimento intrauterino, entre outras (DRAGHIA-AKLI et al., 1999). Várias doenças humanas neurodegenerativas como a síndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker, a doença Creutzfeldt-Jakob, ou a insônia familiar fatal, foram correlacionadas a defeitos no gene que codifica a proteína príon (PrP^C), que podem ser estudadas através de modelos experimentais como camundongos e bovinos contendo deleções dos alelos do gene PrP^C (BUELER et al., 1992; KUROIWA et al., 2004) e, conseqüentemente, resistentes a esse tipo de doença (BUELER et al., 1993). O envelhecimento é outro campo promissor de estudos usando-se animais transgênicos como modelo. Telômeros são sequências altamente repetitivas de DNA presentes nas terminações dos cromossomos, sendo essenciais para sua função e integridade estrutural. Essas estruturas têm seu tamanho continuamente reduzido à medida em que o DNA se replica durante sucessivas mitoses. O encurtamento dos telômeros está relacionado a limitações severas da capacidade regenerativa e com o envelhecimento das células, pois funcionariam como uma espécie de relógio que marcaria o tempo de vida das células. Além disso, muitos tipos de células cancerígenas apresentam alterações no tamanho e estrutura dos seus telômeros, podendo estes estarem relacionados à origem de alguns tipos de câncer (CAWTHON et al., 2003; RUDOLPH et al., 2001). A enzima telomerase é responsável pela formação e reconstrução dos telômeros, sendo sua atividade suprimida nas células somáticas após o nascimento do indivíduo (DJOJOSUBROTO et al., 2003). Após a clonagem da Dolly observaram-se sintomas de envelhecimento precoce que foi relacionado ao encurtamento dos telômeros, o que levantou a hipótese de que a ovelha teria herdado essa característica da célula adulta a partir da qual foi clonada, isto é, a ovelha teria nascido com a idade biológica das células da glândula mamária usadas como doadoras de núcleo (SHIELS et al., 1999). Entretanto, estudos posteriores com camundongos e bovinos refutaram essa hipótese mostrando as sucessivas clonagens ou clonagens a partir de células senescentes (velhas) não provocaram diminuição no comprimento dos telômeros em relação a animais fecundados naturalmente (LANZA et al., 2000; WAKAYAMA et al., 2000). Na verdade, o processo de reprogramação nuclear que ocorre durante o processo de clonagem seria capaz de reativar a telomerase nos embriões clones e, com isso, restaurar o tamanho original dos telômeros (BETTS et al., 2001). Futuramente, estudos

com animais tendo modificações do gene que codifica a telomerase poderão trazer avanços no estudo de câncer e processo de envelhecimento.

8. Considerações e perspectivas

Desde que foram domesticados os primeiros animais, há alguns milhares de anos, o homem vem introduzindo indiretamente nessas espécies, através de cruzamentos direcionados, modificações genéticas de acordo com o seu interesse. A grande diferença que observamos entre as espécies originais e as que criamos atualmente é uma medida de quão profunda foram essas alterações ao longo dos anos, além de ser um reflexo de que a contínua co-evolução da sociedade humana com a utilização de organismos (plantas, animais e microorganismos) domesticados por seleção artificial é um processo inexorável. Até recentemente, essas modificações eram feitas com base no fenótipo observado, sem nenhum conhecimento sobre os mecanismos de herança por trás desse tipo de seleção. Com o avanço do conhecimento, hoje podemos entender melhor o funcionamento dos mecanismos de herança e até alterar seqüências de DNA, de maneira específica e pontual, em favor do nosso interesse. Portanto as discussões éticas surgidas com os primeiros OGMs se referem, em última instância, a continuidade de uma prática milenar que é a atividade da sociedade humana em alterar o meio em que vive (e seus organismos) em seu benefício. Entretanto isso não nos exime da responsabilidade sobre as alterações que praticamos, o que fez surgir um campo de estudo denominado Segurança Biológica.

No que se refere a ganhos de características de interesse em animais de produção, temos que considerar que embora sejam observadas pequenas taxas de respostas à seleção artificial para características individuais, essa mudança é acumulativa e contínua, gerando grandes ganhos ao longo de várias gerações submetidas à seleção. Portanto, quando retiramos um animal de um programa contínuo de melhoramento por cruzamento dirigido para inserirmos alguma modificação genética em seu genoma, temos que considerar que haverá uma perda intrínseca da sua capacidade produtiva. Levando-se em conta o tempo médio de 5 a 7 anos para se gerar e introduzir no sistema de produção um animal transgênico de grande porte, como um bovino, estima-se que o ganho econômico propiciado com a introdução da nova característica deva ser superior a 10% para que haja uma compensação da perda de produtividade devida a retirada do animal do processo contínuo de melhoramento por seleção artificial (CLARK e WHITELAW, 2003; KARATZAS e TURNER, 1997). Além disso, o alto custo do processo de transgenia permite a obtenção de poucos animais para cada evento de modificação genética, o que nos obriga a executar um laborioso processo de introgressão por retrocruzamento do genoma desses animais no rebanho. Para viabilizar a execução desse processo, é fundamental que haja um domínio e uso de técnicas avançadas de reprodução animal como a inseminação artificial associada à transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV). Mesmo com o valoroso apoio dessas técnicas, é inevitável que haja um certo grau de endocruzamento que provocaria perdas na variabilidade genética da população; embora exista algumas estratégias para amenizar o problema da endogamia.

Outra conseqüência da introdução de novas características a produtos como leite e carne está na mudança de mentalidade provocada pelo surgimento de novos seguimentos de mercado. A indústria farmacêutica possui uma história de obtenção de produtos através de sua extração de uma variedade de fontes como microorganismos, plantas, animais e tecidos humanos. Portanto, o isolamento de biofármacos a partir do leite de animais geneticamente modificados não requer mudanças significativas no sistema de produção ou inserção em relação ao mercado consumidor. Entretanto, a perspectiva de criação de animais com novas propriedades e características de produção poderia ter enormes conseqüências na mentalidade e estrutura da indústria pecuária. Por

exemplo, o grande objetivo da indústria de laticínios vem sendo a obtenção de vacas com ganho cada vez maior da capacidade de produção de leite para atender às demandas da indústria, isto é, o objetivo está focado em ganhos quantitativos. No entanto, a transgenia poderá ofertar aos produtores de leite a possibilidade de escolha entre produzir leite com maior quantidade de proteína, desejada na produção de queijo, ou leite contendo nutracêuticos para suprir deficiências de alguns segmentos da população, leite sem lactose para o mercado asiático, leite sem lactoglobulina para pessoas que tenham alergia e esse componente do leite de vaca, ou ainda leite com elevado conteúdo de lactoferrina humana destinado aos neonatos. Isso geraria a criação de novos nichos e uma conseqüente segmentação do mercado, sem precedentes nos dias atuais, provocando a necessidade de uma mudança na mentalidade da cadeia produtiva do leite. Os benefícios dessa segmentação podem ser constatados pela enorme variedade de cultivares ofertados pelo setor agrícola, proporcionando elevados lucros a esse segmento. Mas a questão é: será que a indústria pecuária estaria preparada para tais mudanças? Essa e outras perguntas terão que ser respondidas a medida em que os progressos técnicos e científicos viabilizem a produção de uma variedade de animais transgênicos a um custo cada dia menor e mais acessível ao setor produtivo.

Tabela 1 – Marcos na transgenia e tecnologia reprodutiva em animais de produção (bovinos, caprinos, ovinos e suínos).

Ano	Marco	Referência
1985	1º suíno e ovino transgênicos (TG)	(HAMMER et al., 1985)
1986	Clonagem embriônica em ovinos	(WILLADSEN, 1986)
1991	1º Bovino TG	(KRIMPENFORT et al., 1991)
	Alta produção de biofármaco em leite de caprino	(WRIGHT et al., 1991)
1992	1º suíno TG resistente à infecção viral	(MULLER et al., 1992)
1994	1º suíno expressando inibidores do sistema complemento humano	(FODOR et al., 1994)
1996	1ª ovelha expressando transgene no folículo de lã	(DAMAK et al., 1996)
1997	Clonagem somática por TN em ovinos (Dolly)	(WILMUT et al., 1997)
	Animais de produção TG como modelo para doença humana	(PETTERS et al., 1997)
	1º animal TG produzido por meio de TN	(SCHNIEKE et al., 1997)
1998	1º bovino TG produzido por meio de TN	(CIBELLI et al., 1998)
2000	1º transgenia por recombinação homóloga em animal de produção	(MCCREATH et al., 2000)
2001	1º suíno transgênico “ecologicamente correto”	(GOLOVAN et al., 2001)
	1ª inativação de um alelo em animal de produção (heterozigoto)	(DENNING et al., 2001)
2002	Produção de fibra de biopolímero a partir de células transgênicas	(LAZARIS et al., 2002)
	1º animal TG de produção contendo cromossoma artificial humano	(KUROIWA et al., 2002)
2003	1º bovino TG capaz de produzir leite com composição protéica alterada	(BROPHY et al., 2003)
	1ª inativação completa de um gene em animal de produção	(PHELPS et al., 2003)
2004	1ª inativação seqüencial de dois genes em bovinos	(KUROIWA et al., 2004)
2005	1º bovino TG resistente a infecção bacteriana (mastite)	(WALL et al., 2005)

Tabela 2 – Proteínas humanas secretadas no leite de animais TG

Proteína	Espécie	Aplicação / Tratamento	Empresa	Website
Antitrombina III	Caprino	Coagulante	GTC Biotherapeutics (EUA)	www.transgenics.com
Anticorpos Monoclonais	Caprino	Vacina para malária	GTC Biotherapeutics (EUA)	www.transgenics.com
Glutamato descarboxilase	Caprino	Diabetes tipo I	GTC Biotherapeutics (EUA)	www.transgenics.com
TPA	Caprino	Dissolve trombose	PPL Therapeutics (RU)	www.ppl-therapeutics.com
□-antitripsina	Ovino	Enfisema pulmonar / Fibrose cística	PPL Therapeutics (RU)	www.ppl-therapeutics.com
Fator IX	Ovino	Anticoagulante / Hemofilia A	PPL Therapeutics (RU)	www.ppl-therapeutics.com
Fator VIII	Ovino	Anticoagulante / Hemofilia A	PPL Therapeutics (RU)	www.ppl-therapeutics.com
Anticorpos Policlonais	Bovino	Vacinas	Hematech (EUA)	www.hematech.com
Albumina sérica	Bovino	Hemoderivado	GTC Biotherapeutics (EUA)	www.transgenics.com
Fibrinogênio	Bovino	Coagulante / Cicatrizante	Pharming Group (Hol)	www.pharming.com
Colágeno	Bovino	Inxertia / Cirurgia	Pharming Group (Hol)	www.pharming.com
Lactoferrina	Bovino	Bactericida	Pharming Group (Hol)	www.pharming.com
Inibidor C1	Coelho	Angioderma hereditário	Pharming Group (Hol)	www.pharming.com
Calcitonina	Coelho	Osteoporose	PPL Therapeutics (RU)	www.ppl-therapeutics.com

Nota: A empresa Pharming Group é a atual detentora das patentes desenvolvidas pela PPL Therapeutics.

Referências Bibliográficas

AUCHINCLOSS, H.; SACHS JUNIOR, D. H. Xenogeneic transplantation. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, US, v. 16, p. 433-470, 1998.

BARTHEL, R.; FENG, J.; PIEDRAHITA, J. A.; MCMURRAY, D. N.; TEMPLETON, J. W.; ADAMS, L. G. Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on Brucella abortus survival. **Infection and Immunity**, Washington, US, v. 69, n. 5, p. 3110-3119, 2001.

BETTS, D.; BORDIGNON, V.; HILL, J.; WINGER, Q.; WESTHUSIN, M.; SMITH, L.; KING, W. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 3, p. 1077-1082, 2001.

BLECK, G. T.; WHITE, B. R.; MILLER, D. J.; WHEELER, M. B. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, US, v. 76, n. 12, p. 3072-3078, 1998.

BRACKETT, B. G.; BARANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 68, n. 2, p. 353-357, 1971.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T.; WELLS, D.; L'HUILLIER, P.; LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 2, p. 157-162, 2003.

BUELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R. A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, Cambridge, US, v. 73, n. 7, p. 1339-1347, 1993.

BUELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H. P.; DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S. B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, London, v. 356, n. 6370, p. 577-582, 1992.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, London, v. 380, n. 6569, p. 64-66, 1996.

CAPECCHI, M. R. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, Washington, v. 244, n. 4910, p. 1288-1292, 1989.

CAWTHON, R. M.; SMITH, K. R.; O'BRIEN, E.; SIVATCHENKO, A.; KERBER, R. A. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. **The Lancet**, London, v. 361, n. 9355, p. 393-395, 2003.

CHAN, A. W.; HOMAN, E. J.; BALLOU, L. U.; BURNS, J. C.; BREMEL, R. D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 24, p. 14028-14033, 1998.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONCE DE LEON, F.A.; ROBL, J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v. 280, n. 5367, p. 1256-1258, 1998.

CLARK, A. J.; BISSINGER, P.; BULLOCK, D. W.; DAMAK, S.; WALLACE, R.; WHITELAW, C. B.; YULL, F. Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, AU, v. 6, n. 5, p. 589-598, 1994.

CLARK, J.; WHITELAW, B. A future for transgenic livestock. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2003

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973.

DAMAK, S.; JAY, N. P.; BARRELL, G. K.; BULLOCK, D. W. Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. **Biotechnology**, New York, v. 14, n. 2, p. 181-184, 1996.

DENNING, C.; BURL, S.; AINSLIE, A.; BRACKEN, J.; DINNYES, A.; FLETCHER, J.; KING, T.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W. A.; ROLLO, M.; DE SOUSA, P.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; CLARK, A. J. Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 6, p. 559-562, 2001.

DETWILER, L. A.; RUBENSTEIN, R. Bovine spongiform encephalopathy: an overview. **Asaio J**, v. 46, n. 6, p. S73-79, 2000.

DIAMOND, L. E.; QUINN, C. M.; MARTIN, M. J.; LAWSON, J.; PLATT, J. L.; LOGAN, J. S. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. **Transplantation**, Baltimore, v. 71, n. 1, p. 132-142, 2001.

DJOJOSUBROTO, M. W.; CHOI, Y. S.; LEE, H. W.; RUDOLPH, K. L. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. **Mol Cells**, v. 15, n. 2, p. 164-175, 2003.

DRAGHIA-AKLI, R.; FIOROTTO, M. L.; HILL, L. A.; MALONE, P. B.; DEEVER, D. R.; SCHWARTZ, R. J. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 12, p. 1179-1183, 1999.

DYCK, M. K.; LACROIX, D.; POTHIER, F.; SIRARD, M. A. Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 394-399, 2003.

EBERT, K. M.; DITULLIO, P.; BARRY, C. A.; SCHINDLER, J. E.; AYRES, S. L.; SMITH, T. E.; PELLERIN, L. J.; MEADE, H. M.; DENMAN, J.; ROBERTS, B. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. **Biotechnology**, New York, v. 12, n. 7, p. 699-702, 1994.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, London, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

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 United States of America**, Washington, v. 91, n. 23, p. 11153-11157, 1994.

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTEBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 66, n. 4, p. 895-900, 2002.

GOLOVAN, S. P.; MEIDINGER, R. G.; AJAKAIYE, A.; COTTRILL, M.; WIEDERKEHR, M. Z.; BARNEY, D. J.; PLANTE, C.; POLLARD, J. W.; FAN, M. Z.; HAYES, M. A.; LAURSEN, J.; HJORTH, J. P.; HACKER, R. R.; PHILLIPS, J. P.; FORSBERG, C. W. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 8, p. 741-745, 2001.

GORDON, J. W.; RUDDLE, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, Washington, v. 214, n. 4526, p. 1244-1246, 1981.

GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature Genetics**, New York, v. 17, n. 1, p. 71-74, 1997.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD JUNIOR, 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**, London, v. 315, n. 6021, p. 680-683, 1985.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 70, n. 4, p. 900-909, 2004.

HASEGAWA, K.; MOTSUCHI, W.; TANAKA, S.; DOSAKO, S. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 73-85, 1994.

HONARAMOOZ, A.; BEHBOODI, E.; BLASH, S.; MEGEE, S. O.; DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation in goats. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 64, n. 4, p. 422-428, 2003.

HONARAMOOZ, A.; MEGEE, S. O.; DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation in pigs. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 66, n. 1, p. 21-28, 2002.

IMAIZUMI, T.; LANKFORD, K. L.; BURTON, W. V.; FODOR, W. L.; KOCSIS, J. D.; Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 9, p. 949-953, 2000.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, 1972.

JAENISCH, R.; FAN, H.; CROKER, B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 72, n. 10, p. 4008-4012, 1975.

JOST, B.; VILOTTE, J. L.; DULUC, I.; RODEAU, J. L.; FREUND, J. N. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 2, p. 160-164, 1999.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 67, n. 6, p. 1777-1789, 2002.

KANG, Y.; JIMENEZ-FLORES, R.; RICHARDSON, T. Casein genes and genetic engineering of the caseins. **Basic Life Sciences**, New York, v. 37, p. 95-111, 1986.

KARATZAS, C. N. Designer milk from transgenic clones. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 2, p. 138-139, 2003.

KARATZAS, C. N.; TURNER, J. D. Toward altering milk composition by genetic manipulation: current status and challenges. **Journal of Dairy Science**, Champaign, US, v. 80, n. 9, p. 2225-2232, 1997.

KASINATHAN, P.; KNOTT, J. G.; MOREIRA, P. N.; BURNSIDE, A. S.; JERRY, D. J.; ROBL, J. M. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 64, n. 5, p. 1487-1493, 2001a.

KASINATHAN, P.; KNOTT, J. G.; WANG, Z.; JERRY, D. J.; ROBL, J. M. Production of calves from G1 fibroblasts. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 12, p. 1176-1178, 2001b.

KEEFER, C. L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 5-12, 2004.

KERR, D. E.; PLAUT, K.; BRAMLEY, A. J.; WILLIAMSON, C. M.; LAX, A. J.; MOORE, K.; WELLS, K. D.; WALL, R. J. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 1, p. 66-70, 2001.

KERR, D. E.; WELLNITZ, O. Mammary expression of new genes to combat mastitis. **Journal of Animal Science**, Champaign, US, v. 81, Suppl 3, p. 38-47, 2003.

KRIMPENFORT, P.; RADEMAKERS, A.; EYESTONE, W.; VAN DER SCHANS, A.; VAN DEN BROEK, S.; KOOIMAN, P.; KOOTWIJK, E.; PLATENBURG, G.; PIEPER, F.; STRIJKER, R. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. **Biotechnology**, New York, v. 9, n. 9, p. 844-847, 1991.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends In Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 286-294, 2004.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; CHOI, Y. J.; NAEEM, R.; TOMIZUKA, K.; SULLIVAN, E. J.; KNOTT, J. G.; DUTEAU, A.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A.; ISHIDA, I.; ROBL, J. M. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 9, p. 889-894, 2002.

KUROIWA, Y.; KASINATHAN, P.; MATSUSHITA, H.; SATHIYASELAN, J.; SULLIVAN, E. J.; KAKITANI, M.; TOMIZUKA, K.; ISHIDA, I.; ROBL, J. M. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. **Nature Genetics**, New York, v. 36, n. 7, p. 775-780, 2004.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; BLACKWELL, C.; CRISTOFALO, V. J.; FRANCIS, M. K.; BAERLOCHER, G. M.; MAK, J.; SCHERTZER, M.; CHAVEZ, E. A.; SAWYER, N.; LANSDORP, P. M.; WEST, M. D. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. **Science**, Washington, v. 288, n. 5466, p. 665-669, 2000.

LAZARIS, A.; ARCIDIACONO, S.; HUANG, Y.; ZHOU, J. F.; DUGUAY, F.; CHRETIEN, N.; WELSH, E. A.; SOARES, J. W.; KARATZAS, C. N. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. **Science**, Washington, v. 295, n. 5554, p. 472-476, 2002.

MAIONE, B.; LAVITRANO, M.; SPADAFORA, C.; KIESSLING, A. A. Sperm-mediated gene transfer in mice. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 50, n. 4, p. 406-409, 1998.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MARX, J. Medicine. Building better mouse models for studying cancer. **Science**, Washington, v. 299, n. 5615, p. 1972-1975, 2003.

MASSOUD, M.; ATTAL, J.; THEPOT, D.; POINTU, H.; STINNAKRE, M. G.; THERON, M. C.; LOPEZ, C.; HOUDEBINE, L. M. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. **Reproduction, Nutrition, Developpment**, Paris, v. 36, n. 5, p. 555-563, 1996.

MCCREATH, K. J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K. H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, London, v. 405, n. 6790, p. 1066-1069, 2000.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, London, v. 387, n. 6628, p. 83-90, 1997.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.

MILLER, H. I. As biotech turns 20. **Nature Reviews . Drug Discovery**, London, v. 1, n. 12, p. 1007-1008, 2002.

MULLER, M.; BRENIG, B.; WINNACKER, E. L.; BREM, G. Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. **Gene**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 263-270, 1992.

NAGANO, M.; BRINSTER, C. J.; ORWIG, K. E.; RYU, B. Y.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 23, p. 13090-13095, 2001.

NIBBERING, P. H.; RAVENSBERGEN, E.; WELLING, M. M.; VAN BERKEL, L. A.; VAN BERKEL, P. H.; PAUWELS, E. K.; NUIJENS, J. H. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1469-1476, 2001

NIEMANN, H.; HALTER, R.; CARNWATH, J. W.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; PAUL, D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. **Transgenic Research**, London, v. 8, n. 3, p. 237-247, 1999.

NOBLE, M. S.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; COOK, J. B.; BLECK, G. T.; HURLEY, W. L.; WHEELER, M. B. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine

alpha-lactalbumin in their milk. **Journal of Animal Science**, Champaign, US, v. 80, n. 4, p. 1090-1096, 2002.

NOTTLE, M. B.; HASKARD, K. A.; VERMA, P. J.; DU, Z. T.; GRUPEN, C. G.; MCILFATRICK, S. M.; ASHMAN, R. J.; HARRISON, S. J.; BARLOW, H.; WIGLEY, P. L.; LYONS, I. G.; COWAN, P. J.; CRAWFORD, R. J.; TOLSTOSHEV, P. L.; PEARSE, M. J.; ROBINS, A. J.; D'APICE, A. J. Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. **Transgenic Research**, London, v. 10, n. 6, p. 523-531, 2001.

NUIJENS, J. H.; VAN BERKEL, P. H.; GEERTS, M. E.; HARTEVELT, P. P.; DE BOER, H. A.; VAN VEEN, H. A.; PIEPER, F. R. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, US, v. 272, n. 13, p. 8802-8807, 1997.

PALEYANDA, R. K.; VELANDER, W. H.; LEE, T. K.; SCANDELLA, D. H.; GWAZDAUSKAS, F. C.; KNIGHT, J. W.; HOYER, L. W.; DROHAN, W. N.; LUBON, H. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 10, p. 971-975, 1997.

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**, London, v. 300, n. 5893, p. 611-615, 1982.

PARADIS, K.; LANGFORD, G.; LONG, Z.; HENEINE, W.; SANDSTROM, P.; SWITZER, W. M.; CHAPMAN, L. E.; LOCKEY, C.; ONIONS, D.; OTTO, E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. **Science**, Washington, v. 285, n. 5431, p. 1236-1241, 1999.

PATIENCE, C.; PATTON, G. S.; TAKEUCHI, Y.; WEISS, R. A.; MCCLURE, M. O.; RYDBERG, L.; BREIMER, M. E. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. **The Lancet** (British Ed.), London, v. 352, n. 9129, p. 699-701, 1998.

PATIENCE, C.; TAKEUCHI, Y.; WEISS, R. A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. **Nature Medicine**, New York, v. 3, n. 3, p. 282-286, 1997.

PETTERS, R. M.; ALEXANDER, C. A.; WELLS, K. D.; COLLINS, E. B.; SOMMER, J. R.; BLANTON, M. R.; ROJAS, G.; HAO, Y.; FLOWERS, W. L.; BANIN, E.; CIDECIYAN, A. V.; JACOBSON, S. G.; WONG, F. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 10, p. 965-970, 1997.

PHELPS, C. J.; KOIKE, C.; VAUGHT, T. D.; BOONE, J.; WELLS, K. D.; CHEN, S. H.; BALL, S.; SPECHT, S. M.; POLEJAEVA, I. A.; MONAHAN, J. A.; JOBST, P. M.; SHARMA, S. B.; LAMBORN, A. E.; GARST, A. S.; MOORE, M.; DEMETRIS, A. J.; RUDERT, W. A.; BOTTINO, R.; BERTERA, S.; TRUCCO, M.; STARZL, T. E.; DAI, Y.; AYARES, D. L. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 411-414, 2003.

POLEJAEVA, I. A.; CAMPBELL, K. H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. **Theriogenology**, Stoneham, US, v. 53, n. 1, p. 117-126, 2000.

POWELL, B. C.; WALKER, S. K.; BAWDEN, C. S.; SIVAPRASAD, A. V.; ROGERS, G. E. Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, AU, v. 6, n. 5, p. 615-623, 1994.

PURSEL, V. G.; PINKERT, C. A.; MILLER, K. F.; BOLT, D. J.; CAMPBELL, R. G.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E. Genetic engineering of livestock. **Science**, Washington, v. 244, n. 4910, p. 1281-1288, 1989.

ROBERTSON, E.; BRADLEY, A.; KUEHN, M.; EVANS, M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. **Nature**, London, v. 323, n. 6087, p. 445-448, 1986.

RUDOLPH, K. L.; MILLARD, M.; BOSENBERG, M. W.; DEPINHO, R. A. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. **Nature Genetics**, New York, v. 28, n. 2, p. 155-159, 2001.

RUDOLPH, N.S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. **Trends In Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 9, p. 367-374, 1999.

SAITO, S.; SAWAI, K.; UGAI, H.; MORIYASU, S.; MINAMIHASHI, A.; YAMAMOTO, Y.; HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S.; PAN, J.; MURATA, T.; KOBAYASHI, Y.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. K. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Orlando, US, v. 309, n. 1, p. 104-113, 2003.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, Washington, v. 278, n. 5346, p. 2130-2133, 1997.

SEIDEL JUNIOR, G. E. Resource requirements for transgenic livestock research. **Journal of Animal Science**, Champaign, US, v.71, Suppl 3, p. 26-33, 1993.

SHIELS, P. G.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H.; WADDINGTON, D.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A. E. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. **Nature**, London, v. 399, n. 6734, p. 316-317, 1999.

SHIM, H.; GUTIERREZ-ADAN, A.; CHEN, L. R.; BONDURANT, R. H.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 57, n. 5, p. 1089-1095, 1997.

SOUKKA, T.; TENOVUO, J.; LENANDER-LUMIKARI, M. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 223-228, 1992.

SOUZA, C. J.; MACDOUGALL, C.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic

receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, GB, v. 169, n. 2, p. R1-6, 2001.

STACEY, A.; SCHNIEKE, A.; KERR, M.; SCOTT, A.; MCKEE, C.; COTTINGHAM, I.; BINAS, B.; WILDE, C.; COLMAN, A. Lactation is disrupted by alpha-lactalbumin deficiency and can be restored by human alpha-lactalbumin gene replacement in mice. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 7, p. 2835-2839, 1995.

STINNAKRE, M. G.; VILOTTE, J. L.; SOULIER, S.; MERCIER, J. C. Creation and phenotypic analysis of alpha-lactalbumin-deficient mice. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 14, p. 6544-6548, 1994.

SULLIVAN, E. J.; KASINATHAN, S.; KASINATHAN, P.; ROBL, J. M.; COLLAS, P. Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 70, n. 1, p. 146-153, 2004.

THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, Cambridge, US, v. 51, n. 3, p. 503-512, 1987.

VAN BERKEL, P. H.; WELLING, M. M.; GEERTS, M.; VAN VEEN, H. A.; RAVENSBERGEN, B.; SALAHEDDINE, M.; PAUWELS, E. K.; PIEPER, F.; NUIJENS, J. H.; NIBBERING, P. H. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, n. 5, p. 484-487, 2002.

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 United States of America**, Washington, v. 89, n. 24, p. 12003-12007, 1992.

WAKAYAMA, T.; SHINKAI, Y.; TAMASHIRO, K. L.; NIIDA, H.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; OGURA, A.; TANEMURA, K.; TACHIBANA, M.; PERRY, A. C.; COLGAN, D. F.; MOMBAERTS, P.; YANAGIMACHI, R. Cloning of mice to six generations. **Nature**, Nature, v. 407, n. 6802, p. 318-319, 2000.

WALL, R. J.; KERR, D. E.; BONDIOLI, K. R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **Journal of Dairy Science**, Champaign, US, v. 80, n. 9, p. 2213-2224, 1997.

WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, V. G.; WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, n. 4, p. 445-451, 2005.

WATERSTON, R. H.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRNEY, E. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, London, v. 420, n. 6915, p. 520-562, 2002.

WEISSMANN, C.; ENARI, M.; KLOHN, P. C.; ROSSI, D.; FLECHSIG, E. Transmission of prions. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, Suppl 4, p. 16378-16383, 2002.

WHEELER, M. B. Production of transgenic livestock: promise fulfilled. **Journal of Animal Science**, Champaign, US, v. 81 Suppl 3, p. 32-37, 2003.

WILLADSEN, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, London, v. 320, n. 6057, p. 63-65, 1986.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiological Reviews**, Baltimore, US, v. 85, n. 2, p. 635-678, 2005.

WRIGHT, G.; CARVER, A.; COTTOM, D.; REEVES, D.; SCOTT, A.; SIMONS, P.; WILMUT, I.; GARNER, I.; COLMAN, A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. **Biotechnology**, New York, v. 9, n. 9, p. 830-834, 1991.

ZAIDI, A.; SCHMOECKEL, M.; BHATTI, F.; WATERWORTH, P.; TOLAN, M.; COZZI, E.; CHAVEZ, G.; LANGFORD, G.; THIRU, S.; WALLWORK, J.; WHITE, D.; FRIEND, P. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. **Transplantation**, Baltimore, US, v. 65, n. 12, p. 1584-1590, 1998.

ZAWADA, W. M.; CIBELLI, J. B.; CHOI, P. K.; CLARKSON, E. D.; GOLUEKE, P. J.; WITTA, S. E.; BELL, K. P.; KANE, J.; PONCE DE LEON, F. A.; JERRY, D. J.; ROBL, J. M.; FREED, C. R.; STICE, S. L. Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. **Nature Medicine**, New York, v. 4, n. 5, p. 569-574, 1998.