

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

VICTOR HUGO VIEIRA RODRIGUES

**CAPRINOS FUNDADORES TRANSGÊNICOS PARA O FATOR
ESTIMULANTE DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS HUMANO (hG-CSF):
PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS E BIOQUÍMICOS ATÉ OS 285 DIAS DE
IDADE**

FORTALEZA

2010

VICTOR HUGO VIEIRA RODRIGUES

CAPRINOS FUNDADORES TRANSGÊNICOS PARA O FATOR
ESTIMULANTE DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS HUMANO (hG-CSF):
PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS E BIOQUÍMICOS ATÉ OS 285 DIAS DE
IDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

Orientador (a): Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.

FORTALEZA

2010

R696c Rodrigues, Victor Hugo Vieira

Caprinos Fundadores Transgênicos para o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF): parâmetros leucocitários e bioquímicos até os 285 dias de idade. _ Fortaleza, 2010.

68p.; iL

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Caprinos 2. Transgênese 3. hG-CSF 4. Neutrofilia I.
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.0824

VICTOR HUGO VIEIRA RODRIGUES

CAPRINOS FUNDADORES TRANSGÊNICOS PARA O FATOR
ESTIMULANTE DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS HUMANO (hG-CSF):
PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS E BIOQUÍMICOS ATÉ OS 285 DIAS DE
IDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora

Dra. Irina Aleksandrovina Serova
Instituto de Citologia e Genética/
Academia de Ciências da Rússia
Examinadora

Dra. Luciana Magalhães Melo
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora

Dedico esta dissertação às pessoas essenciais na condução e conclusão de mais esta etapa da minha vida. Minha amada Roberta e minha querida avó Maria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade de realizar um mestrado de nível reconhecido e de qualidade e seriedade inquestionáveis.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) pela acolhida e pelos grandes ensinamentos gerados. Obrigado por me proporcionar conhecer a pesquisa e me ensinar o caminho para hoje me tornar mestre.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro indispensável na realização de todas as etapas desse projeto de pesquisa.

À Deus, ser indescritível que conhece o mais íntimo do nosso ser. Aquele que nos protege, ampara e principalmente guia pelos caminhos mais corretos simplesmente pelo grande amor que nos dedica em todos os momentos de nossas vidas.

Minha gratidão aos meus amados pais Maria Elizabeth Vieira Teixeira e Francisco Ferreira Rodrigues por tudo de bom que me ensinaram, por cada momento de dedicação na educação e principalmente por reafirmarem em meu ser a que caráter e educação são a maior das heranças que se pode deixar para um filho. Por vocês o mais sublime e indescritível amor!

À minha querida vó, Maria de Araújo Vieira, pela sua atenção, compreensão, paciência e pelo seu amor por mim. Coisas que em vários momentos deixei de ter com ela. Minhas desculpas! A senhora é responsável por eu chegar até aqui em minha vida e jamais terei como agradecer tudo o que a senhora fez por mim desde o tempo da graduação.

Ao meu grande amor, Roberta Cristina, pela sua companhia, seu carinho. Seria ninguém sem seu incentivo. Minhas conquistas serão sempre oferecidas a você, pois, além de você fazer parte delas, você também é minha vida. Eu te amo muito!

Ao professor Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas pela possibilidade de desenvolver este trabalho de mestrado, o qual me trouxe enorme crescimento pessoal e científico.

À Dra. Luciana Magalhães Melo, dedico um agradecimento especial pela sua dedicação, suas idéias, seu tempo, seu trabalho e sua sabedoria na orientação e execução desse trabalho. Muito obrigado pelos grandes ensinamentos e sincera dedicação!

Ao professor Dr. Dárcio Ítalo, pela amizade, pelos ensinamentos e confiança.

À Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, pela colaboração e contribuições científicas importantes e necessárias para a execução do trabalho. Muito obrigado!

À Dra. Irina Aleksandrovina Serova, pelo auxílio, pela colaboração importantíssima para o laboratório. Foi uma honra ter conhecido essa pesquisadora tão especial. Terei a senhora como um exemplo para minha vida profissional.

Ao meu amigo Francisco Carlos, em quem pude confiar e aprender ser um mestrando. Muito obrigado, Carlos!

A Karlliely e Suely, pela permanência da amizade, pelos ensinamentos, confiança que vocês mútua. Isto foi muito importante enfrentar os momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), Carlos Henrique, Antônio Carlos, Agostinho Neto, Raylene Ramos, Ribrio Ivan, Joanna Gonçalves, Alexsandra Fernandes, Carla Rozilene, Érica Albuquerque, Talles Monte, Cláudia Luciano, Iana Sales, Maiara Pinheiro, por todos os momentos de descontração, trabalhos e amizade.

Aos amigos (ex-alunos e ex-estagiários do LFCR), Jefferson, Eudislane, Felipe Braga, Caio Brito, Hayanne, Batista Cajazeiras, pela convivência alegre e pela ajuda na rotina de trabalho.

Aos amigos do programa de pós-graduação, Matheus Wagner, Cláudio Henrique, Nadja, Paiva, Mirian, Rosivaldo Júnior, Carlos Alberto, Cleidson, Liliane, Fabiana, Cláudio Afonso, Lívia, Ívina, Francisco Léo, Régis, D'Ávila, Diana, Mariana, Renan, Nicodemos, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores e funcionários da FAVET e PPGCV, pelo profissionalismo e respeito.

Aos funcionários e amigos Selmar, César e Cícero pelo grande auxílio no trabalho e pela amizade. Muito obrigado por tudo!

RESUMO

Animais de produção transgênicos secretando proteínas de interesse terapêutico em seu leite são importantes para atender uma demanda em diversos medicamentos de uso humano. No entanto, é importante conhecer as condições que o transgene possa acarretar aos animais geneticamente modificados. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os parâmetros leucocitários e bioquímicos em dois caprinos transgênicos para o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) e controle (dois caprinos não transgênicos). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA-UECE parecer nº 12/2005) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO, CQB nº 0228/2006). Aos 45 dias e, em seguida, quinzenalmente, amostras de sangue foram colhidas para avaliação hematológica (contagem total e diferencial de leucócitos), bioquímica (uréia, creatinina, glicose, AST e ALT), bem como realizar a dosagem de hG-CSF no soro. Além disso, foi avaliado o desenvolvimento corporal dos animais. Os caprinos transgênicos apresentaram a contagem de leucócitos 2,5 a 3,7 vezes maior em relação aos não transgênicos. Esta leucocitose teve uma forte correlação com a neutrofilia ($R^2 = 0,97$) e foi seguida por níveis séricos baixos de hG-CSF (< 20 pg/mL) ou nulos. Embora a contagem de neutrófilos tenha decrescido nos animais transgênicos antes dos 157 dias, a neutrofilia persistiu até aos 285 dias de idade. Não ocorreram mudanças nas outras contagens celulares. O perfil bioquímico indicou funções hepáticas e renais normais. Além disso, o ganho de peso revelou um desenvolvimento corporal esperado para espécie. Em conclusão, caprinos jovens transgênicos para o hG-CSF permaneceram saudáveis embora tenham apresentado uma neutrofilia persistente.

Palavras-chave: Caprinos. Transgênese. hG-CSF. Neutrofilia.

ABSTRACT

Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) has been used as a hematopoietic growth factor due to its efficacy against neutropenia and chemotherapy-induced leucopenia. This project was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA-UECE, n° 12/2005) and the National Technical Commission on Biosafety (CTNBIO, CQB n° 0228/2006). Our group obtained a male and a female goat transgenic for hG-CSF. The two transgenic animals and non-transgenic were monitored up to 285 days-of-age. On 45 days and biweekly thereafter blood samples were collected for hematological evaluation (total and differential white blood cell counts), serum biochemistry (urea, creatinine, glucose, AST and ALT) and hG-CSF analysis. Transgenic goats presented the leucocyte count 2.5 to 3.7-fold greater than non-transgenics. This leukocytosis have a strong relationship with neutrophilia ($R^2=0.97$), which was followed by low (<20pg/mL) or null serum levels of hG-CSF. Strikingly, although the neutrophil counts decreased in transgenic goats before they reached 157 days-old, the neutrophilia persisted until 285 days-of-age. No changes in other cell counts were detected. The serum biochemistry profiles indicated normal liver and renal functions and the weight gain points to the typical body development. In conclusion, hG-CSF-transgenic young goat presented persistent neutrophilia, with low or absent ectopic cytokine expression, and remained without general health disorders.

Keywords: Goat. Transgenesis. Neutrophilia. hG-CSF

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1-	Camundongo transgênico para o hormônio do crescimento humano.....	19
Figura 2-	Esquema da diferenciação celular a partir das células tronco pluripotente..	28
Figura 3-	Estrutura molecular do G-CSF.....	30
Figura 4-	Tipos de hG-CSF disponíveis no mercado.....	32

Capítulo 1

Figura 1 -	Caprinos transgênicos para o hG-CSF.....	49
Figura 2 -	Perfil leucocitário de caprinos transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF dos 45 aos 285 dias de idade.....	50
Figura 3 -	Correlação entre as contagens de leucócitos totais e de neutrófilos em caprinos transgênicos e não transgênicos para hG-CSF dos 45 aos 285 dias de idade.....	51

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 - Proteínas recombinantes produzidas por caprinos transgênicos.....23

Capítulo 1

Tabela 1 - Desenvolvimento corporal de caprinos transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF dos 45 aos 285 dias de idade.....	47
Tabela 2 - Contagem total e diferencial de leucócitos em caprinos jovens transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF.....	48
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos séricos de caprinos jovens transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ALT – Alanina aminotransferase
- AST – Aspartato aminotransferase
- BFU-E – Unidade formadora de eritrócitos
- CFU – Unidades formadoras de colônias
- CFU-E – Unidade formadora de colônias de eritróides
- CFU-Eo – Unidade formadora de colônias de eosinófilos
- CFU-MEG – Unidade formadora de colônias megacariócitos
- CSFs – Fatores estimulantes de colônias
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Epo - Eritropoietina
- FDA – United States Food & Drug Administration
- G-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos
- GM-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
- hG-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos humano
- HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
- hLZ – Lisozima humana
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-3 – Interleucina 3
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-6 – Interleucina 6
- INF- γ - Interferon γ
- KDa – Quilo Daltons
- Kg – Quilograma
- LFCR – Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
- LPS – Lipopolissacarídeos
- M-CSF – Fator estimulante de macrófago

mL – Mililitro

μg - Micrograma

ng - Nanogramas

NK – Natural killer

SCF – Fator de células-tronco

TNCS – Transferência nuclear de células somáticas

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TPO - Tireoperoxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 TRANSGÊNESE.....	18
2.1.1 TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS.....	20
2.1.2 CAPRINOS TRANSGÊNICOS.....	21
2.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS/REPRODUTIVOS DE MAMÍFEROS TRANSGÊNICOS.....	24
2.3 FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS HUMANO (hG-CSF).....	27
2.3.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	29
2.3.2 UTILIZAÇÃO CLÍNICA.....	30
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	34
5 OBJETIVOS.....	35
5.1 GERAL.....	35
5.2 ESPECÍFICOS.....	35
6 CAPÍTULO 1.....	36
7 CONCLUSÕES.....	52
8 PERSPECTIVAS.....	53
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÊNDICE A.....	66
APÊNDICE B.....	68

1 INTRODUÇÃO

A transgênese é uma modificação da informação genética de um organismo através de técnicas de DNA recombinante, a qual o DNA exógeno está incorporado de modo estável no seu genoma e, portanto, transmitindo o transgene à sua descendência por herança Mendeliana (PESQUEIRO et al., 2002). A geração de transgênicos visa à obtenção de organismos com características novas e/ou melhoradas em relação ao organismo original. A aplicação desta técnica tem proporcionado avanços científicos em diversos campos do conhecimento a partir da modificação, introdução ou inativação de sequências de DNA que aceleram o melhoramento do rebanho regulando características de importância econômica (WALL et al., 1997; HOUDEBINE, 1998; WHEELER, 2003).

Dentre as aplicações desta biotécnica a mais frequente é a obtenção de animais transgênicos para a produção de proteínas farmacêuticas recombinantes de alta qualidade (HOUDEBINE, 2009). A produção destas proteínas no leite de animais transgênicos tem sido atrativo nos últimos anos devido à capacidade de síntese de proteínas pela glândula mamária (FREITAS, 2003; NIEMANN & KUES, 2007). Assim, a utilização desses animais como biorreatores representa uma alternativa promissora para possibilitar o desenvolvimento da terapêutica, por meio da produção de proteínas recombinantes de elevado valor biológico à saúde humana (FREITAS et al., 2007).

Dentre estas proteínas recombinantes, destaca-se o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF), pois é um fator estimulante de crescimento hematopoético bastante utilizado em medicina humana, que estimula a proliferação e a diferenciação de células precursoras de neutrófilos, além de incrementar algumas das propriedades funcionais de neutrófilos maduros (MORSTYN & BURGESS, 1988). Desde sua produção como proteína humana recombinante (SOUZA et al., 1986), o hG-CSF tem sido o fator de crescimento hematopoético mais utilizado mundialmente.

Para aplicações bem sucedidas da engenharia genética serem incluídas nos sistemas de produção animal, a saúde e o bem-estar destes animais devem ser considerados. Isto também auxiliaria a melhorar a percepção do uso de animais transgênicos na pecuária, bem como a percepção pública da biotecnologia em geral (JACKSON et al., 2010). Desta forma, é necessário que seja realizado um monitoramento físico e subjetivo da linhagem transgênica a partir da expressão do transgene durante a vida (gestação, nascimento, puberdade até a vida

adulta). Estas informações podem contribuir para o conhecimento necessário para que sejam produzidas proteínas recombinantes importantes para a saúde humana sem prejudicar a sanidade dos animais transgênicos.

Assim, o monitoramento de parâmetros fisiológicos, especialmente aqueles ligados ao potencial de ação *in vivo* do transgene, é um aspecto importante envolvendo o modelo animal. Além disso, essas investigações podem esclarecer a segurança de aplicação da tecnologia transgênica em animais de produção, assim como a viabilidade dos mesmos. O presente estudo teve por objetivo monitorar os parâmetros leucocitários e os níveis séricos de hG-CSF em dois caprinos transgênicos produzidos em nosso laboratório. Além disso, os perfis bioquímicos séricos (níveis de glicose, uréia, creatinina, AST e ALT) e o desenvolvimento corporal dos animais foram avaliados visando inferência do desempenho das funções hepática e renal, bem como o acesso a possíveis distúrbios gerais de saúde.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSGÊNESE

A produção de indivíduos transgênicos é uma das técnicas mais fascinante desenvolvidas nas últimas décadas. Esta técnica consiste em modificar a informação genética de um organismo através de técnicas de DNA recombinante. A manipulação do material genético geralmente envolve a capacidade de isolar, cortar, obter a construção gênica com promotores, que mandam a expressão da proteína de interesse a tecidos específicos e transferir sequências de DNA que correspondem a genes específicos (MONTALDO, 2006). Assim, animais transgênicos são aqueles que apresentam uma sequência de DNA exógeno, chamado “transgene”, o qual é transmitido aos descendentes por herança mendeliana normal (PESQUEIRO et al., 2002; NIEMANN & KUES, 2007).

A utilização desta biotécnica tem permitido conhecer as etapas envolvidas nos processos de expressão gênica e de patologias. Além disso, a produção zootécnica pode ser incrementada através da inserção de características novas ao organismo original. Outra aplicação é sua utilização na produção de fármacos de interesse em saúde humana, tornando-se, deste modo, uma alternativa vantajosa para a produção de proteínas recombinantes, quando comparada com outros sistemas convencionais. Isto devido à possibilidade de produção em grande escala, aos padrões corretos de glicosilação e modificações pós-traducionais, custos muito baixos e por possuir a possibilidade de propagação de transgênicos fundadores com demonstração de alta estabilidade de expressão (MAGA & MURRAY, 1995; KUES & NIEMANN, 2004).

Os primeiros embriões transgênicos foram gerados em 1971 pela técnica de inserção de gametas masculinos modificados. Embriões transgênicos de coelhos foram obtidos pela fecundação de oócitos com espermatozóides pré-incubados com DNA de vírus-símio 40 (BRACKETT et al., 1971). Posteriormente, Jaenisch & Mintz (1974) mostraram a incorporação do material genético exógeno em crias derivadas de embriões injetados com o DNA do mesmo vírus.

Gordon et al. (1980) produziram o primeiro camundongo transgênico pela técnica de microinjeção pró-nuclear, o qual foi utilizado um plasmídeo recombinante composto por segmento de DNA viral (Herpes vírus e vírus símio 40) inserido no plasmídeo bacteriano

pBR322. Dois anos depois, Palmiter et al. (1982) obtiveram o primeiro camundongo transgênico com propriedades fenotípicas modificadas (Figura 1). Posteriormente, Hammer et al. (1985), produziram coelhos, suínos e ovinos transgênicos. A partir de então, tornou-se possível a obtenção de outros animais transgênicos como bovinos (KRIMPENFORT et al., 1991), caprinos (EBERT et al., 1991) e ovelhas (WRIGHT et al., 1991).



Figura 1: Camundongo transgênico (tamanho maior) para o hormônio do crescimento humano. (Fonte: <http://www.ufsm.br/blg220/hidden/histmolecular.htm>).

Animais transgênicos possuem diversas aplicações. Além do interesse científico é fundamental para o estudo dos genes e sua regulamentação, incluindo a modalização de doenças, a transgênese em animais tem o potencial de acelerar a melhoria do rebanho, por meio da introdução de novos genes ou modificar a expressão de genes endógenos que regulam características de interesse econômico (WALL et al., 1997; WEELER, 2003). Suínos transgênicos para o crescimento acelerado por meio da superexpressão do gene do hormônio do crescimento (PURSEL et al., 1997), vacas leiteiras apresentando resistência à *Staphylococcus mastitis* como resultado da expressão de lysostafina em seu leite (WALL et al., 2005), vacas com superexpressão do gene da caseína para aumentar a produção de queijo

(BROPHY et al., 2003), constituem alguns exemplos da aplicação da tecnologia transgênica na pecuária.

2.1.1 Técnicas para produção de animais transgênicos

Técnicas e metodologias têm sido implantadas para a produção de animais transgênicos. A microinjeção pró-nuclear de DNA é uma destas técnicas. É um método clássico de transferência gênica e permanece praticamente inalterado desde seu desenvolvimento, a qual consiste na introdução de DNA exógeno no pró-núcleo de oócitos fertilizados (PALMITER et al., 1982).

Animais transgênicos foram também obtidos pelo uso da clonagem ou transferência nuclear de células somáticas (TNCS), a qual associada à manipulação de células cultivadas resultou no nascimento de ovinos transgênicos para o fator IX de coagulação (SCHNIEKE et al., 1997). Vários outros animais foram produzidos por esta técnica para expressar diferentes tipos de proteínas, como por exemplo: bovinos (CIBELLI et al., 1998); caprinos (REGGIO et al., 2001) e suínos (DAI et al., 2002).

A transferência de genes mediada por espermatozóides é outra técnica para obtenção de animais transgênicos (BRACKETT et al., 1971). Para interação do DNA exógeno com o espermatozóide utiliza-se a incubação de espermatozóides com DNA exógeno. Após a interação, o DNA exógeno é internalizado, associa-se fortemente com o núcleo e é reorganizado com o DNA genômico do espermatozóide em locais preferenciais. Esta técnica também tem sido citada em várias espécies como, por exemplo: camundongos (LAVITRANO et al., 1989; MAIONE et al., 1998), suínos (GANDOLFI et al., 1996; SPERANDIO et al., 1996) e bovinos (PEREZ et al., 1991; SPERANDIO et al., 1996; ANZAR & BUHR, 2006).

Outra alternativa para produção de animais transgênicos é a utilização de células tronco embrionárias. Apesar da produção de quimeras pelo uso desta técnica em camundongos (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981), suínos (WHEELER, 1994), coelhos (GILES, 1993) e bovinos (IWASAKI, 2001), a transmissão do transgene às suas crias foi eficientemente encontrada em camundongos e aves (DYCE et al., 2003).

2.1.2 Caprinos transgênicos

Caprinos transgênicos têm sido produzidos principalmente por microinjeção pró-nuclear da construção de interesse em embriões produzidos *in vivo* (GOOTWINE et al., 1997; LEE et al., 2000; FREITAS et al., 2007). Neste método, fêmeas doadoras de embriões são submetidas à sincronização de estro, superovulação, acasalamento ou inseminação artificial e lavagem de oviduto para a recuperação dos zigotos presumíveis (KEEFER, 2004; MOURA et al., 2010). Assim a produção eficiente e a qualidade da fase pró-nuclear são essenciais para o êxito de um programa de caprinos transgênicos. Com a produção destes animais, proteínas recombinantes de importância farmacêutica são produzidas no leite dos mesmos, sendo de grande interesse devido à alta capacidade das células da glândula mamária em sintetizar proteínas (MAGA & MURRAY, 1995; KEEFER, 2004; HOUDEBINE, 2005).

A aplicação desta técnica nesta espécie é bastante promissora, pois a mesma apresenta um menor custo de manutenção, maturidade sexual mais precoce e um período relativamente curto de gestação quando comparada à espécie bovina (FREITAS, 2003). Além disso, em relação à produção de proteínas recombinantes, caprinos apresentam-se como um modelo bastante interessante devido a sua capacidade de produzir centenas de quilogramas de proteínas recombinantes por ano (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004).

Diferentes proteínas recombinantes têm sido produzidas a partir da utilização de caprinos transgênicos (Tabela 1) com a finalidade de obter benefícios na área da saúde, biologia, biotecnologia, microbiologia, genética e pecuária. Assim a produção em larga escala destas proteínas deverá causar grande impacto sobre a indústria farmacêutica beneficiando a saúde humana. Um exemplo é a proteína antitrombina humana recombinante (Atryn®), a qual foi a primeira proteína recombinante produzida por animais e autorizada para o uso comercial (EDMUNDS et al., 1998 e 2009). Em um estudo realizado por Ko et al. (2000), os quais produziram o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) no leite de caprinos nativos coreanos (*Capra hircus aegagrus*) que possuíam um cassete de expressão contendo o promotor beta caseína caprino específico da glândula mamária e o gene G-CSF humano. O G-CSF humano produzido pela glândula mamária da cabra transgênica foi biologicamente ativo e continha uma molécula de carboidrato O-glicosilado. Este foi o primeiro relato de produção de hG-CSF no leite de animais transgênicos.

No Brasil, um projeto pioneiro foi realizado pelo grupo da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Instituto de Citologia e Genética da Academia de Ciências da Rússia (ACR), com o intuito de obter caprinos transgênicos para o hG-CSF. Nesse sentido, foram obtidos em 2002 os primeiros caprinos nascidos na América Latina após a microinjeção pró-nuclear de zigotos com a construção de DNA. Porém, estes animais não possuíam o transgene (FREITAS et al., 2003).

Posteriormente, utilizando doadoras da raça Saanen, o grupo obteve o nascimento do primeiro caprino transgênico da América Latina (FREITAS et al., 2007). Finalmente, realizando uma comparação entre raças (Saanen e Canindé) como doadoras de embriões, foram obtidos mais três animais transgênicos, sendo um natimorto da raça Saanen e dois, de ambos os sexos, da raça Canindé. Estes animais contêm o gene com o promotor do gene α S1-caseína caprina/hG-CSF. A cabra transgênica apresentou uma concentração 70 μ g por mililitro de hG-CSF no leite, sendo determinada pelo método ELISA (FREITAS et al., 2010).

Tabela 1 - Proteínas recombinantes produzidas por caprinos transgênicos.

	Uso	Local	Referência
Ativador do plasminogênio tissular humano	Infarto agudo do miocárdio e trombose	EUA	Ebert et al., 1991; Baldassarre et al., 2004
Antitrombina III humana	Resistência à heparina	EUA	Edmunds et al., 1998
Anticorpos monoclonais	Vários incluindo câncer e AIDS	EUA	Young et al., 1998; Pollock et al., 2000
Antígenos contra malária	Vacinação	EUA	Behboodi et al., 2005
α -fetoproteína humana	Doenças autoimunes	EUA	Parker et al., 2004
Butiril-colinesterase humana	Intoxicação por organofosforados	EUA	Cerasoli et al., 2005
Fator IX da cascata da coagulação	Coagulação	China	Huang et al., 2001
Fator estimulante de colônias granulócitos	Neutropenia (câncer e AIDS)	Coréia; Brasil	Ko et al., 2000; Lee et al., 2000; Freitas et al., 2007
Lactoferrina humana	Antimicrobiano, antitumoral, antiinflamatório	China	Zhang et al., 2008
Proteína de teia de aranha	Fios de sutura, próteses	EUA	Karatzas et al., 1999
Proteína de superfície do antígeno do vírus da hepatite B	Vacina contra Hepatite B	China	Zhang et al., 1997
Lisozima	Antimicrobiano	EUA	Maga et al., 2006

2.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS/REPRODUTIVOS DE MAMÍFEROS TRANSGÊNICOS

Animais transgênicos são utilizados para diversos fins. Aplicações da transgenia animal pode ser dividido em três categorias principais: (i) para obter informações sobre a função do gene e regulação, bem como sobre as doenças em humanos, (ii) a obtenção de produtos de alto valor (proteínas recombinantes farmacêuticas) a ser utilizado na medicina humana, (iii) melhorar os produtos de origem animal para o consumo humano (HOUDEBINE, 2005). Todas estas aplicações são diretamente relacionadas à saúde humana.

Na década de 80, foram demonstradas as primeiras tentativas de geração de animais transgênicos, incluindo camundongos, ovelhas, coelhos e porcos com potencial de expressão protéica exógena (GORDON et al., 1980; PALMITER et al., 1982; HAMMER et al., 1985). Desde então, a produção de diversas proteínas recombinantes de interesse farmacêutico tem sido descrita em animais transgênicos gerados por ferramentas da biologia molecular em conjunto com técnicas reprodutivas avançadas.

Ainda assim, o número de animais transgênicos no mundo não é ainda expressivo e conseqüentemente as informações sobre o desempenho produtivo e reprodutivo, bem como as condições fisiológicas e de saúde são escassas. Estas informações devem ser conhecidas, pois para os mesmos produzirem as substâncias para as quais foram idealizados devem estar saudáveis.

Além disso, se faz necessário informações à respeito da qualidade das proteínas recombinantes, pois a atividade biológica destas proteínas pode influenciar a fisiologia dos animais que as expressam. O hG-CSF é uma citocina com efeitos da atividade biológica muito alta, isto faz com que seja importante monitorar a influência desta citocina na hematopoiese nos animais.

Em camundongos transgênicos expressando até 0,5 ng/mL de hG-CSF na urina, foi verificado que o número de neutrófilos, entre transgênicos e não transgênicos apresentaram o mesmo padrão, apesar de ter sido observado uma fuga do hG-CSF para o sangue. Os autores relataram que a elevada concentração de hG-CSF na urina poderia afetar o ciclo estral nas fêmeas, porém sem causar dano à saúde dos transgênicos. Entretanto, os autores enfatizam que este mecanismo ainda não foi claramente entendido (KIM et al., 2006).

Com o intuito de estudar possíveis consequências adversas de uma elevada e persistente produção de neutrófilos, camundongos transgênicos, expressando hG-CSF no leite, foram monitorados por um período de mais de um ano (SERIZAWA et al., 2000). Estes animais apresentaram granulocitopoiese e neutrofilia. A contínua granulocitopoiese medular e extramedular resultaram em alterações nos ossos e fígado. Entretanto, mesmo tendo sido observada uma infiltração pulmonar por neutrófilos maduros, lesões pulmonares raramente foram encontradas. Embora tenha existido um aumento persistente nos neutrófilos, a mortalidade não diferiu entre os camundongos transgênicos e não transgênicos. Desta forma, os autores concluíram que outros fatores, além da elevada produção de hG-CSF e da neutrofilia, possivelmente, são necessários para o desenvolvimento de danos teciduais crônicos e agudos mediados por neutrófilos.

A transferência nuclear, usando células primárias transfectadas, é um método eficiente para a produção de caprinos transgênicos. Todavia, anormalidades na reprogramação associadas com o processo podem resultar em animais com problemas de saúde. Behboodi et al. (2005) estudaram a sanidade, o desempenho reprodutivo e a produção de leite de quatro cabras transgênicas expressando o antígeno para malária produzidas por transferência nuclear. A saúde e o crescimento destes animais foram monitorados e comparados com quatro cabras não transgênicas. Os autores não observaram diferenças no peso ao nascimento e ao desmame entre os animais transgênicos e controle. Dados do hemograma, como as células brancas e vermelhas do sangue, também foram considerados normais nos animais transgênicos. Além disso, os valores bioquímicos, como creatinina, glicose e colesterol, estiveram dentro da faixa de normalidade. As cabras transgênicas apresentaram uma produtividade de leite normal produzindo a proteína recombinante. Desta forma, os autores concluíram que a obtenção de animais fundadores transgênicos saudáveis é possível através da técnica de transferência nuclear e que esses animais podem ser usados para a produção de uma vacina contra malária.

Jackson et al. (2010) avaliaram as características reprodutivas e de crescimento em caprinos transgênicos para a lisozima humana (hZL). Os autores relataram que não houve diferenças nos parâmetros testados de eficiência reprodutiva ou crescimento da linhagem transgênica comparadas a cabras não transgênicas. Foi sugerido, então, que os índices de

padrão de reprodução e desenvolvimento corporal na linhagem de cabras transgênicas não são comprometidos pela presença e expressão do transgene.

Machos caprinos da linhagem transgênica para a hLZ não foram significativamente diferentes dos bodes não transgênicos (controle) em relação à sua capacidade reprodutiva. Os valores para características seminais dos animais transgênicos foram dentro dos parâmetros normais para a espécie; volume 0,1 – 1,5 mL, concentração 2 – 6 bilhões de espermatozoides por mL ejaculado, viabilidade 82 – 93%, morfologia normal 80 – 95% e motilidade total 54 – 80%. No geral, a presença do transgene hLZ no genoma destes animais parece não interferir com a produção normal de sêmen (JACKSON et al., 2010). Achados similares têm sido relatados em bovinos e coelhos transgênicos (RICHT et al., 2006; CHRENEK et al., 2007). Em relação ao crescimento dos animais transgênicos, de acordo com os dados de Jackson et al. (2010), o local de integração do transgene pareceu não interromper o gene endógeno de crescimento no útero, enquanto os dois grupos de animais, transgênicos e controle não transgênicos, não demonstraram diferenças significativas no peso ao nascer. Os machos tinham, em média, maior peso no nascimento do que as fêmeas para ambos os grupos, o que é comum na maioria dos mamíferos (LAWRENCE & FOWLER, 1997). Além disso, não houve diferença no peso ao nascer durante os três anos de estudo, indicando que as diferenças não tiveram impacto sobre o crescimento pré-natal dos filhotes.

A sanidade e o bem-estar dos animais criados para fins de produção são de elevada importância para o público e os produtores. Para aplicações bem sucedidas da engenharia genética serem incluídas nos sistemas de produção animal, a saúde e o bem-estar destes animais devem ser considerados. Isto também auxiliaria a melhorar a percepção do uso de animais transgênicos na pecuária, bem como a percepção pública da biotecnologia em geral (JACKSON et al., 2010).

As primeiras tentativas da engenharia genética em animais resultaram em alguns problemas fisiológicos nos animais transgênicos, atribuídas ao controle inadequado da expressão do transgene resultando na superexpressão ou expressão em tecidos não específicos (PURSEL et al., 1990). O acoplamento de gene com promotor específico para um tecido apropriado e padrões de expressão diminuí os impactos negativos no bem-estar devido à expressão gênica (PURSEL et al., 2004). Estudos que avaliam os parâmetros gerais de

produção animal são, portanto, úteis na avaliação da saúde geral de uma linhagem transgênica.

O bem-estar animal é um conceito que envolve tanto avaliações físicas e subjetivas da linhagem transgênica (DENNIS, 2002; BUEHR et al., 2003; DUNCAN, 2005; WELLS et al., 2006; MERTENS & RULICKE, 2007). Van Reenen (2009) sugeriu que as observações em relação ao bem-estar animal de uma linhagem transgênica poderiam ser feitas no momento da expressão do transgene, bem como nos diferentes estágios de vida, incluindo gestação e nascimento, nascimento até a puberdade e um período representativo da vida adulta, tal como o desempenho reprodutivo. A multiplicidade de fatores pode afetar o crescimento de um animal, como a qualidade e quantidade dos alimentos, habitação, doença e a temperatura. Em termos de animais transgênicos, a introdução de um gene exógeno também pode afetar o animal, dependendo do local da integração do transgene no genoma e interações do produto do transgene no animal.

Informações sobre animais transgênicos, bem como o bem-estar dos mesmos, podem contribuir para o conhecimento necessário para tomar decisões de regulamentação sobre ciência baseada no uso de animais transgênicos. A capacidade de produzir uma linhagem de animais para gerar novos produtos e benefícios somente será aceita para o uso pelos consumidores e órgãos reguladores se a saúde geral e o bem-estar destes animais forem estabelecidos.

2.3 FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS HUMANO (hG-CSF)

A produção de células hematopoéticas é mantida pelas células-tronco multipotentes comuns na medula óssea, as quais representam em torno de 0,01% das células nucleadas (ZAGO et al., 2001). A diferenciação celular inicia-se a partir das células-tronco multipotentes que se dividem para gerar mais células-tronco (auto-renovação) e várias células progenitoras comprometidas (geralmente designadas como Unidades Formadoras de Colônias – UFCs), que são capazes de originar apenas alguns tipos celulares. As células progenitoras comprometidas diferenciam-se em células sanguíneas maduras sob a influência de moléculas sinalizadoras chamadas Fatores Estimulantes de Colônias (CSFs), entre elas está o G-CSF (Figura 2).

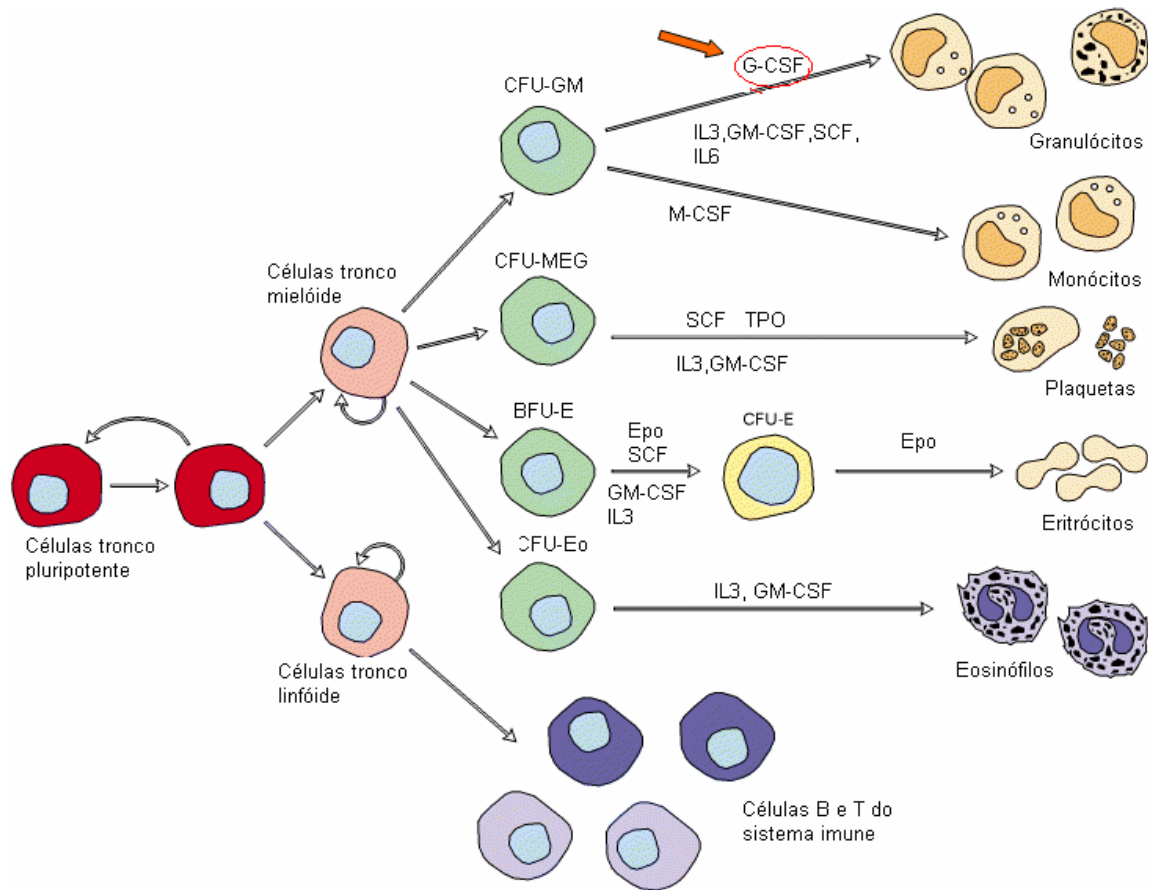


Figura 2: Esquema da diferenciação celular a partir das células tronco multipotentes para formação das células da linhagem granulocítica. CFU-GM (Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos Macrófagos); CFU-MEG (Unidade Formadora de Colônias Megacariócitos); BFU-E (Unidade Formadora de Eritrócitos); CFU-Eo (Unidade Formadora de Colônias de Eosinófilos); SCF (Fator de Células Tronco); TPO (Tireoperoxidase); Epo (Eritropoietina); CFU-E (Unidade Formadora de Colônias de Eritróides); M-CSF (Fator Estimulante de Colônia de Macrófago). (Fonte: Zago et al., 2001).

A primeira linha de defesa celular contra agentes infecciosos compreende: granulócitos polimorfonucleares, macrófagos, células NK (*Natural Killer*) (KURITZKES et al., 1998; WITTMAN et al., 2006). Assim, o G-CSF torna-se uma das principais citocinas envolvidas na estratégia de defesa do sistema imune (WITTMAN et al., 2006), pois seu papel é estimular a proliferação, diferenciação e atividade dos granulócitos polimorfonucleares

(GOUGH et al., 1997; BABALOLA et al., 2004). Estas células exercem a função de defesa por quimiotaxia, fagocitose, morte intracelular e liberação de vários produtos, incluindo enzimas lisossomais (WITTMAN et al., 2006).

Os granulócitos recebem esta denominação por possuírem grânulos densamente coráveis em seu citoplasma e se dividem em neutrófilos (células fagocitárias mais numerosas e importantes da resposta inata), eosinófilos (importantes na defesa contra infecções por parasitas e em respostas alérgica), basófilos (participam de reações de hipersensibilidade imediata e tem, provavelmente, uma função similar e complementar a dos eosinófilos e mastócitos).

O G-CSF atua principalmente promovendo a maturação dos neutrófilos e estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido com o processo de segmentação nuclear dos neutrófilos maduros. Também atua em outras linhagens celulares, apresentando um importante papel na mobilização de células-tronco hematopoéticas da medula óssea para a circulação (BARREDA et al., 2004). Também é capaz de modular a resposta inflamatória, reduzindo a liberação das citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos ativados (BONEBERG & HARTUG, 2002).

2.3.1 Caracterização molecular

O G-CSF é produzido por uma variedade de células, como fibroblastos, células endoteliais, linfócitos T, monócitos e macrófagos, sendo que estes dois últimos são considerados os maiores produtores (JANEWAY et al., 2000; BARREDA et al., 2004). O aumento da produção e liberação desta proteína tem sido observado após estimulação com lipopolissacarídeos (LPS), IL-1, TNF- α , IL-3, IL-4, GM-CSF, M-CSF, INF- γ e *Mycobacterium avium*.

O G-CSF é uma molécula monomérica em solução que possui uma sequência de 174 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 18,8 kDa. A molécula contém um resíduo de cisteína livre na posição 17 e duas pontes dissulfeto, que são importantes para a estabilidade estrutural da proteína e dobramento correto desta longa cadeia de aminoácidos (LU et al., 1989).

A estrutura secundária da molécula contém aproximadamente 69% de α -hélice, 4% de folha- β , 5% de β -curvatura, sendo que o restante da molécula ainda não foi caracterizado (LU et al., 1989). Além disso, é composta por quatro hélices, denominada A, B, C e D, como mostra a figura 3. A hélice A forma-se entre os resíduos 11-39, a B entre 71-91, a C entre 100-123 e a D entre 143-172 (HILL et al., 1993).

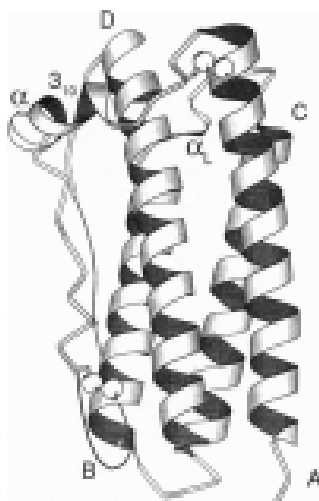


Figura 3: Estrutura molecular do G-CSF. Hélice A, B, C e D que formam a estrutura da molécula do G-CSF juntos com α -hélice e folha- β . (Fonte: HILL et al., 1993).

2.3.2 Utilização clínica

O G-CSF tem sido utilizado no tratamento de diversas patologias, sobretudo em neutropenias provocadas pela quimioterapia usada no tratamento de tumores, pela radioterapia e pelo uso de drogas que suprimem a produção de células mielóides (HARTUNG et al., 1998). Desde 1991, o uso deste biofármaco é liberado pela agência reguladora dos Estados Unidos (U.S. Food & Administration – FDA), com a finalidade de diminuir a incidência de infecções associadas com neutropenia induzida por quimioterapia em pacientes com câncer. A associação da neutropenia com infecções continua sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer que recebem tratamento de quimioterapia (CARBONERO et al., 2001). Inúmeros estudos vêm apresentando resultados positivos com o uso de G-CSF nestes pacientes.

As aplicações clínicas mais estudadas do hG-CSF foram realizadas principalmente com a finalidade de melhora da neutropenia (ASANO, 1988). As áreas de investigação incluem mielossupressão após o uso da quimioterapia contra o câncer seguido de transplantes autólogo ou alogênico da medula óssea (OHNO et al., 1991). O hG-CSF também tem sido experimentado em tratamentos de várias neutropenias crônicas associadas com a anemia aplástica, síndromes mielodisplásicas, neutropenia idiopática, neutropenia cíclica (HANADA & ONO, 1990) e AIDS (ASANO, 1991).

Nas neutropenias iatrogênicas, uma única injeção diária de hG-CSF em doses farmacológicas (2-5µg/kg/dia) tem sido apresentada para reduzir marcadamente a duração de neutropenia. A descontinuação da administração de hG-CSF resulta em uma queda rápida na contagem de neutrófilos no sangue periférico. Porém, os neutrófilos não diminuem abaixo do observado em pacientes controle (ASANO, 1991).

Nos últimos anos, outros alvos para o uso de G-CSF vem sendo apresentados, como o tratamento de infecções em pacientes não neutropênicos, a fim de melhorar sua defesa imune, bem como medida preventiva (KURITZKES et al., 1998; WITTMAN et al., 2006). Entre eles, há relatos de benefícios em caso de peritonites e infecção tecidual em ratos e camundongos (WITTMAN et al., 2006).

Análises realizadas em pacientes portadores de HIV em estágio avançado demonstraram que a administração de G-CSF foi efetiva na prevenção de neutropenia severa, levando a uma redução na incidência e duração de infecções bacterianas e diminuição dos dias de tratamento com antibióticos e dias de hospitalização.

Devido ao aumento do número de pacientes com problemas no coração nos últimos anos, realizou-se um estudo, no qual sugere que citocinas hematopoéticas, como G-CSF, melhoram a função cardíaca e reduzem a taxa de mortalidade após o infarto no miocárdio em camundongos. Essa ação é possível devido ao efeito protetor sobre os cardiomiócitos, a promoção da angiogênese e a prevenção da remodelação cardíaca do ventrículo esquerdo após infarto (HARADA et al., 2005).

Atualmente, existem disponíveis para o uso clínico duas formas de hG-CSF (Figura 4). A primeira é não glicosilada e denominada Filgrastim e a outra, glicosilada, chama-se Lenograstim. O Filgrastim é obtido através do cultivo bacteriano tradicional (*Escherichia*

coli), enquanto o Lenograstim é obtido por cultivo de células do ovário de Hamster chinês (CHO).

Estudo comparando o efeito do Lenograstim e Filgrastim nas células sanguíneas após altas doses de quimioterapia observou-se que ambas as preparações de G-CSF foram eficazes na aceleração da recuperação de leucócitos em altas doses de quimioterapia após transplante autólogo de células tronco no sangue periférico (HÜTTMANN et al., 2005).



Figura 4: Tipos de hG-CSF disponíveis no mercado. A: forma não glicosilada (Filgrastim) e B: forma glicosilada (Lenograstim).

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de caprinos transgênicos como biorreatores representa uma alternativa promissora por possibilitar o crescimento necessário à terapêutica, por meio da produção de proteínas recombinantes de elevado valor biológicos à saúde humana, como anti-trombina III, ativador de plasminogênio tissular, fator IX da cascata de coagulação e o hG-CSF, os quais já foram expressos no leite de cabras transgênicas, sendo que a maioria se encontra em testes para liberação de sua utilização. A rápida expansão e o crescimento da biotecnologia, nos recentes anos, proporcionaram a expressão de proteínas em diferentes sistemas biológicos de produção, dirigidos principalmente à medicina humana.

Apesar disso, há um número reduzido de animais transgênicos para o hG-CSF no mundo, tornando os estudos a respeito dos parâmetros hematológicos e bioquímicos escassos. Assim, é de fundamental importância a avaliação periódica e contínua desses animais no sentido de observar possíveis alterações fisiológicas que possam comprometer a sanidade destes. Dessa forma, estudos investigativos são imprescindíveis para o conhecimento de prováveis danos à saúde que podem ocorrer nos animais transgênicos comprometendo a sua sobrevivência.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Caprinos fundadores transgênicos para o hG-CSF apresentam leucocitose associada à neutrofilia sem danos na saúde em geral quando monitorados até os 285 dias de idade.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os parâmetros leucocitários e bioquímicos em caprinos transgênicos fundadores para o hG-CSF até os 285 dias de idade.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar um estudo comparativo entre caprinos transgênicos para o hG-CSF e não transgênicos (controle), até os 285 dias de idade em relação aos parâmetros:

- Leucocitário (contagem total e diferencial).
- Bioquímicos séricos da concentração de uréia, creatinina, glicemia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), avaliando a saúde de ambos os grupos.

Realizar a quantificação dos níveis de hG-CSF no soro sanguíneo dos animais transgênicos para o hG-CSF até 285 dias de vida.

Avaliar o desenvolvimento corporal através do ganho diário do peso dos animais transgênicos e não transgênicos.

6 CAPÍTULO 1

Neutrofilia persistente em caprinos jovens transgênicos para o hG-CSF

Persistent neutrophilia in hG-CSF-transgenic young goats

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
(Submetido em outubro de 2010)

Neutrofilia persistente em caprinos jovens transgênicos para o hG-CSF

[*Persistent neutrophilia in hG-CSF-transgenic young goats*]

V.H.V. Rodrigues¹, R.R. Moura¹, A.F. Pereira¹, E.S. Albuquerque¹, C.H.S. Melo¹, I.A. Serova², L.E. Andreeva³, O.L. Serov², D.C.S. Nunes-Pinheiro⁴, L.M. Melo¹, V.J.F. Freitas^{1*}

¹ Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução-LFCR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE

² Instituto de Citologia e Genética, Novosibirsk, Rússia

³ Instituto de Genética Molecular, Moscou, Rússia

⁴ Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE

* Autor para correspondência: Vicente José de F. Freitas

Lab. de Fisiologia e Controle da Reprodução, Av. Dedé Brasil, 1700 – Fortaleza-CE, Brazil, Tel.: 85 31019861 fax: 85 31019840 e-mail addresses: vjff@pq.cnpq.br

RESUMO

O Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) é utilizado como fator de crescimento hematopoético por sua ação em neutropenia e leucopenia induzida por quimioterapia. Nosso grupo obteve um macho e uma fêmea caprina transgênicos para o hG-CSF. Dois animais transgênicos e dois não transgênicos foram monitorados até os 285 dias de idade. Aos 45 dias e, em seguida, quinzenalmente, amostras de sangue foram colhidas para avaliação hematológica (contagem total e diferencial de leucócitos), bioquímica (uréia, creatinina, glicose, AST e ALT) e de hG-CSF no soro. Os caprinos transgênicos apresentaram a contagem de leucócitos 2,5 a 3,7 vezes maior que a dos não transgênicos. Esta leucocitose teve uma forte correlação com a neutrofilia ($R^2 = 0,97$) e foi seguida por níveis séricos baixos (< 20 pg/mL) ou nulos de hG-CSF. Surpreendentemente, embora a contagem de neutrófilos tenha decrescido nos animais transgênicos antes dos 157 dias, a neutrofilia persistiu até aos 285 dias de idade. Não ocorreram mudanças nas outras contagens celulares. O perfil bioquímico indicou funções hepáticas e renais normais. Além disso, o ganho de peso revelou um

desenvolvimento corporal esperado. Em conclusão, caprinos jovens transgênicos para o hG-CSF permaneceram saudáveis embora tenham apresentado uma neutrofilia persistente.

Palavras-chave: caprino, transgênese, neutrofilia, hG-CSF

ABSTRACT

Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) has been used as a hematopoietic growth factor due to its efficacy against neutropenia and chemotherapy-induced leucopenia. Our group obtained a male and a female goat transgenic for hG-CSF. The two transgenic animals and non-transgenic were monitored up to 285 days-of-age. On 45 days and biweekly thereafter blood samples were collected for hematological evaluation (total and differential white blood cell counts), serum biochemistry (urea, creatinine, glucose, AST and ALT) and hG-CSF analysis. Transgenic goats presented the leucocyte count 2.5 to 3.7-fold greater than non-transgenics. This leukocytosis have a strong relationship with neutrophilia ($R^2=0.97$), which was followed by low (<20pg/mL) or null serum levels of hG-CSF. Strikingly, although the neutrophil counts decreased in transgenic goats before they reached 157 days-old, the neutrophilia persisted until 285 days-of-age. No changes in other cell counts were detected. The serum biochemistry profiles indicated normal liver and renal functions and the weight gain points to the typical body development. In conclusion, hG-CSF-transgenic young goat presented persistent neutrophilia, with low or absent ectopic cytokine expression, and remained without general health disorders.

Keywords: goat, transgenesis, neutrophilia, hG-CSF

INTRODUÇÃO

Animais transgênicos, isto é, indivíduos que possuem uma construção de DNA exógeno incorporada em seu genoma, possuem várias aplicações. Além do interesse científico para o estudo de genes e de sua regulação, a tecnologia transgênica apresenta potencial para acelerar a melhoria do rebanho através da introdução de novos genes ou pela modificação da expressão de genes endógenos que regulam características produtivas (Wheeler, 2003). A produção de proteínas recombinantes no leite de animais transgênicos tem apresentado crescente interesse nos últimos anos devido à elevada

capacidade de síntese de proteínas na glândula mamária (Maga e Murray, 1995). Como resultado, animais transgênicos são capazes de produzir proteínas recombinantes de maneira mais eficiente que sistemas tradicionais baseados em microorganismos ou células animais. Esta oportunidade econômica tem estimulado o desenvolvimento de uma nova indústria e de metodologias para aumentar a eficiência na produção de animais transgênicos.

Caprinos são utilizados como biorreatores devido às suas características específicas, tais como: curto período de gestação e baixos custos de manutenção, quando comparados aos bovinos. Existem vários relatos da obtenção de caprinos transgênicos (Ebert et al., 1991; Gootwine et al., 1997) e da exequibilidade da produção em larga escala para aplicação comercial (Baldassarre et al., 2003; Baldassarre e Karatzas 2004).

Entre as várias proteínas com possibilidade de produção por biorreatores, o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano (hG-CSF) se destaca por sua importância em medicina humana, pois é um fator de crescimento hematopoético que estimula a proliferação e a diferenciação de células precursoras de neutrófilos, além de incrementar algumas das propriedades funcionais de neutrófilos maduros (Morstyn e Burgess, 1988). Desde sua produção como proteína humana recombinante (Souza et al., 1986), o hG-CSF tem sido o fator de crescimento hematopoiético mais utilizado mundialmente. Além disso, o hG-CSF estimula a mobilização de células progenitoras em transplantes autólogos ou alogênicos (Viret et al. 2006).

Como parte de um grande projeto para produção de caprinos transgênicos, recentemente nosso grupo produziu dois animais transgênicos para o hG-CSF (Freitas et al., 2010). Mundialmente, o número de animais transgênicos ainda é muito pequeno e a maior parte dos registros existentes para o hG-CSF referem-se à espécie murina. Alguns desses relatos têm demonstrado a ação biológica factível desta citocina no próprio animal transgênico, causando, como esperado, elevação do número de células hematopoiéticas em órgãos percussores e granulocitose (Yamada et al, 1996). Contudo, a extensão e intensidade de ação do hG-CSF em animais transgênicos não é plenamente previsível, tendo-se, inclusive, relatos de ausência de neutrofilia (Kim et al., 2006) e presença de linfocitose (Serizawa et al., 2000) em camundongos.

Assim, o monitoramento de parâmetros fisiológicos, especialmente aqueles ligados ao potencial de ação *in vivo* do transgene, é um aspecto importante envolvendo o modelo

animal. Além disso, essas investigações podem esclarecer a segurança de aplicação da tecnologia transgênica em animais de produção, assim como a viabilidade dos mesmos. O presente estudo teve por objetivo monitorar os parâmetros leucocitários e os níveis séricos de hG-CSF em dois caprinos transgênicos produzidos em nosso laboratório. Além disso, os perfis bioquímicos séricos (níveis de glicose, uréia, creatinina, AST e ALT) e o desenvolvimento corporal dos animais foram avaliados visando inferência do desempenho das funções hepática e renal, bem como o acesso a possíveis distúrbios gerais de saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas de bem estar animal (Van Zutphen e Balls, 1997) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), assim como pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO, CQB nº 0228/06). Foram utilizados quatro caprinos da raça Canindé, sendo dois transgênicos (um macho e uma fêmea) para o hG-CSF e dois não transgênicos (um macho e uma fêmea). Os animais transgênicos fundadores foram obtidos por microinjeção pró-nuclear usando uma construção de DNA consistindo do gene que codifica para o hG-CSF sob a regulação de promotor para a α S1-caseína caprina, como previamente descrito (Freitas et al., 2007). Os caprinos não transgênicos foram confirmados como negativos para a presença do transgene por PCR e foram nascidos do mesmo programa de transgênese, tendo mesma idade dos transgênicos e servindo de controle para os experimentos descritos a seguir.

Os animais foram monitorados dos 45 aos 285 dias de idade com pesagens semanais. Após o desmame, aos 90 dias, os animais foram alimentados com feno (*Cynodon dactylon*) de qualidade e com acesso livre à água e sal mineral. Nesta etapa, a dieta foi suplementada com 50 a 100 g de concentrado (18% de proteína). Os caprinos foram sempre mantidos sob as boas práticas de manejo, incluindo tratamento anti-helmíntico e suplementação vitamínica.

As colheitas de sangue foram realizadas quinzenalmente, sempre pela manhã, por venopunção da jugular. O sangue foi colhido em tubos vacutainer (BD Vacutainer, New Jersey, EUA) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para contagem total e diferencial de leucócitos, realizada de forma automatizada no equipamento CELL-Dyn

3700 (Abbot Park, Illinois, EUA). Amostras colhidas sem anticoagulante foram centrifugadas ($3000 \times g$ por 8 min) e o soro produzido foi utilizado para subsequente análise bioquímica e dosagem do hG-CSF. As quantificações bioquímicas dos níveis séricos de uréia, creatinina e glicose, e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas utilizando-se o aparelho BT 3000 plus (Winer Lab, Rosário, Argentina). Finalmente, os níveis séricos de hG-CSF foram mensurados através do método ELISA sanduíche, utilizando o kit Hu G-CSF ELISA, seguindo as instruções descritas pelo fabricante (Invitrogen, Camarillo, EUA).

Amostras de soro sanguíneo foram diluídas na proporção de 1:5 e 1:10 (v:v), em solução tamponante fornecida pelo fabricante. As quantificações foram realizadas na leitora de microplacas multi-modo Synergy HT (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, EUA).

Os dados obtidos para os animais transgênicos e não transgênicos foram expressos como média \pm DP e comparados quantitativamente, através de ANOVA e teste de Tukey com $P = 0,05$, ou qualitativamente, com os valores de referência para caprinos (Boyd, 1984; Kaneco et al., 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caprinos transgênicos são utilizados como biorreatores para produção de medicamentos de interesse em saúde humana por serem capazes de secretá-los no leite. O nosso grupo obteve um macho e uma fêmea portando o gene para o hG-CSF fusionado ao promotor da $\alpha 1$ -caseína caprina. Os dois animais transgênicos nasceram e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental (Fig. 1). Ambos, macho e fêmea, cresceram e mostraram atividade sexual por volta dos quatro e sete meses de vida, respectivamente. A partir dessa idade, o macho apresenta libido e parâmetros espermáticos normais e a fêmea exibe duração de ciclo estral normal para a espécie (dados não mostrados). O desenvolvimento corporal, avaliado pelo peso (Tab. 1), não mostrou diferenças estatísticas entre os animais experimentais ($P > 0,05$) e foi também semelhante para o citado na literatura para animais da raça Canindé e com idade semelhante (Lisboa et al., 2010).

A utilização de animais como biorreatores, visando secreção exócrina da proteína recombinante na glândula mamária tem sido amplamente utilizada. Atualmente, vários

promotores de genes de proteínas do leite na glândula mamária já foram investigados e avaliados em diferentes espécies, inclusive em animais de produção (Houdebine, 2009). Apesar do controle do promotor, a expressão ectópica do gene exógeno tem sido relatada (Ko et al., 2000; Kim et al., 2006), podendo ser a principal causa da ação biológica *in vivo* da proteína recombinante no animal transgênico. Nesse contexto, a obtenção de animais transgênicos expressando moléculas biologicamente ativas, como o hG-CSF, traz consigo a preocupação com a potencial ação *in vivo* da proteína recombinante.

No presente estudo, parâmetros leucocitários de dois caprinos transgênicos para o hG-CSF foram avaliados desde os 45 até 285 dias de vida, uma vez que esta citocina atua sobre as células sanguíneas da linhagem granulocítica. Simultaneamente, os níveis séricos de hG-CSF foram avaliados em todos os animais, com o intuito de investigar a existência de expressão ectópica da proteína recombinante nesse período. Os animais transgênicos apresentaram leucocitose significativa com marcada neutrofilia, que persistiu durante todo o período observado (Fig. 2). Comparando-se animais do mesmo gênero (Tab. 2), os caprinos transgênicos apresentaram contagem de leucócitos ($27,29 \pm 12,39 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $21,84 \pm 9,58 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente) cerca de 2,5 a 3,7 vezes superiores à dos não transgênicos, tendo esses últimos apresentado valores dentro da faixa normal para a espécie ($10,99 \pm 2,27 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $5,91 \pm 2,01 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente). Essa leucocitose foi produzida pelo elevado número de neutrófilos ($21,86 \pm 12,07 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $14,83 \pm 9,06 \times 10^3/\mu\text{L}$ para macho e fêmea transgênica, respectivamente), sem alterações nas contagens de outros granulócitos.

Em camundongos transgênicos para o hG-CSF sob controle do promotor da uroplaquina II, para expressão na urina, os níveis séricos na citocina variaram de zero até 5 pg/mL de acordo com a linhagem (Kim et al. 2006). Tais níveis de expressão ectópica do hG-CSF não foram suficientes para alterar a celularidade sanguínea dos camundongos transgênicos, de forma que a contagem total e diferencial de neutrófilos no sangue periférico desses animais foi similar à dos animais controle (não transgênicos).

Intrigantemente, nos caprinos transgênicos do presente estudo, assim como logicamente nos animais controle, nenhuma quantidade detectável de hG-CSF esteve presente nas amostras de soro sanguíneo dos animais durante o período experimental. Esses resultados indicam que a expressão ectópica do transgene é nula ou muito baixa, ou

seja, menor que 20 pg/mL, que é o limite de detecção do kit ELISA utilizado. No entanto, a mensuração mais sensível do hG-CSF no soro desses animais está sendo realizada e ajudará a esclarecer a intensa neutrofilia observada.

Lee et al. (2000) obtiveram, através de microinjeção pró-nuclear de zigotos, uma cabra transgênica carregando o gene para o hG-CSF fusionado ao promotor da β -caseína caprina. Concomitante à obtenção de 50 μ g/mL de proteína recombinante biologicamente ativa no leite, os níveis séricos no animal atingiram 408 pg/mL (Ko et al., 2000). Apesar de não investigarem detalhadamente as alterações leucocitárias, os autores correlacionaram a neutrofilia mensurada durante o período de lactação à ação da citocina.

Linhagens murinas transgênicas para o hG-CSF também já foram previamente produzidas com o intuito de estabelecer um modelo experimental para estudo de atividade biológica da citocina (Yamada et al., 1996). Assim, usando o promotor SR α , os animais transgênicos possuíam níveis séricos tão altos quanto 1000 pg de hG-CSF por mililitro de soro e possuíam transcritos do gene exógeno em todos os tecidos. Nesses animais, além da previsível leucocitose com marcada neutrofilia, o achado mais surpreendente foi o elevado número de linfócitos na circulação periférica. No presente estudo, as contagens de linfócitos e monócitos para os caprinos transgênicos e não transgênicos apresentaram-se dentro dos limites normais para a espécie (Tab. 2). É possível que a ação do hG-CSF sobre os precursores hematopoiéticos não granulocíticos, acarretando linfocitose, seja observada apenas na presença de altos níveis séricos de hG-CSF, como nas linhagens murinas, ou seja, um achado intrínseco à espécie animal.

Ainda no modelo transgênico murino com superexpressão de hG-CSF, os achados de necropsia mais incidentes incluíram infiltrados granulocíticos em órgãos como fígado, pulmões, baço, timo e linfonodos, além de esplenomegalia e aumento dos linfonodos. Apesar dos diferentes achados histopatológicos relativos à intensa e crônica granulocitopoiese, os autores não relataram danos teciduais letais nos indivíduos transgênicos até um ano de vida (Serizawa et al., 2000). Em se tratando do modelo caprino para transgênese, assim como nas demais espécies animais de produção, a avaliação histopatológica dos diversos tecidos é dificultada, ou mesmo inviabilizada, devido ao restrito número de exemplares existentes. Nos espécimes do presente estudo,

os perfis bioquímicos séricos foram mensurados (Tab. 3) visando inferência do desempenho das funções hepática e renal, bem como o acesso a possíveis distúrbios gerais de saúde. Assim, os níveis séricos de glicose, uréia, creatinina, AST e ALT, para os transgênicos e controle encontraram-se dentro das faixas de valores de referência para a espécie caprina.

Um achado surpreendente, obtido no presente trabalho com caprinos transgênicos, foi a dinâmica da contagem leucocitária durante o primeiro ano de vida desses animais.

Assim, as mais elevadas contagens de leucócitos totais ($59,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $50,7 \times 10^3/\mu\text{L}$, em macho e fêmea, respectivamente) ocorreram logo no início do período mais precoce de observação, ou seja, aos 45 dias de vida (Fig. 2). Em seguida, até os 157 dias de vida, os valores mensurados decresceram para 26 a 28% dos valores leucocitários iniciais ($16,7 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $13,4 \times 10^3/\mu\text{L}$, para macho e fêmea, respectivamente). Essas oscilações foram intimamente acompanhadas por flutuações nas contagens de neutrófilos, a ponto do estabelecimento de uma correlação fortemente positiva e direta ($R^2 = 0,97$) entre essas contagens em caprinos transgênicos (Fig. 3). No período subsequente aos 157 dias de vida até o final do experimento, observou-se uma maior estabilidade nas contagens de leucócitos ($20,6 \pm 5,32 \times 10^3/\mu\text{L}$ para o macho e $18,21 \pm 3,42 \times 10^3/\mu\text{L}$ para a fêmea) e de neutrófilos ($15,19 \pm 5,15 \times 10^3/\mu\text{L}$ para o macho e $11,50 \pm 3,33 \times 10^3/\mu\text{L}$ para a fêmea), apesar dos valores permanecerem altos e acima da referência normal para caprinos. Estudos adicionais envolvendo a regulação hormonal do promotor do gene $\alpha 1$ -caseína, especialmente durante o período de desenvolvimento embrionário/fetal, são requeridos para esclarecer esse comportamento leucocitário de animais jovens.

CONCLUSÃO

Os caprinos transgênicos para o hG-CSF apresentaram persistente leucocitose, com marcada neutrofilia, concomitante a níveis séricos muito baixos ($<20\text{pg/mL}$), ou nulos, da citocina. Os animais mantiveram-se clinicamente saudáveis até os 285 dias de vida e, apesar do decréscimo das contagens de leucócitos e de neutrófilos até os 157 dias de vida, os valores permaneceram acima dos normais para a espécie. A mensuração mais sensível dos níveis séricos de hG-CSF, bem como investigações adicionais envolvendo a regulação hormonal do promotor do gene $\alpha 1$ -caseína, ajudarão a esclarecer esse comportamento leucocitário observado em caprinos transgênicos jovens.

AGRADECIMENTOS

À equipe do LFCR pelo manejo com os animais, ao suporte financeiro recebido da FINEP, CNPq e PNDP/CAPES e aos Drs. Oleg Serov, Lyudmila Andreeva e Irina Aleksandrovina Serova da Academia de Ciências da Rússia. V.J.F. Freitas é bolsista PQ 1D do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.255-266, 2004.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N. et al. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v.59, p.831-839, 2003.

BOYD, J.W. The interpretation of serum biochemistry test results in domestic animals. *Vet. Clin. Pathol.*, v.13, p.7-14, 1984.

EBERT, K.M.; SELGRATH, J.P.; DiTULLIO, P. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, v.9, p.835-838, 1991.

FREITAS, V.J.F.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E. et al. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *An. Acad. Bras. Ciên.*, v.79, p.585-592, 2007.

FREITAS, V.J.F.; TEIXEIRA, D.I.A.; MELO, L.M. et al. Generation of transgenic naturalized goats producing human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) in Brazil. *Transgenic Res.*, v.19, p.146, 2010.

GOOTWINE, E.; BARASH, I.; BOR, A. et al. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology*, v.48, p.485-499, 1997.

HOUEBINE, L.M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.32, p.107-121, 2009.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. USA: Academic Press, 1997. 932p.

- KO, J.H.; LEE, C.S.; KIM, K.H. et al. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Res.*, v.9, p.215-222, 2000.
- KIM M.O.; KIM S.H; LEE S.R. et al. Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) into mouse urine. *Life Sci.*, v.78, p.1003-1009, 2006.
- LEE, C.S.; FANG, N.Z.; KOO, D.B. et al. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegragus*. *Small Rum. Res.*, v.37, p.57-63, 2000.
- LISBOA, A.C.C.; FURTADO, D.A.; MEDEIROS, A.N. et al. Quantitative characteristics of the carcasses of Moxotó and Canindé goats fed diets with two different energy levels. *R. Bras. Zootec.*, v.39, p.1565-1570, 2010.
- MAGA, E.A.; MURRAY, J.D. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology*, v.13, p.1452-1457, 1995.
- MORSTYN, G.; BURGESS, A.W. Hemopoietic growth factors: A review. *Cancer Res.*, v.48, p.5624-5637, 1988.
- SERIZAWA, I.; AMANO, K.; ISHII, H. et al. Long-term overexpression of human granulocyte colony-stimulating factor in transgenic mice: persistent neutrophilia with no increased mortality for more than one year. *Citokine*, v.12, p.630-635, 2000.
- SOUZA, L.M.; BOONE, T.C.; GABRILOVE, J. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, v.232, p.61-65, 1986.
- VAN ZUTPHEN, L.F.M.; BALLS, M. Animal alternatives, welfare, and ethics. Amsterdam: Elsevier, 1997. 1081p.
- VIRET, F.; GONÇALVES, A.; TARFIN, C. et al. G-CSF in oncology. *Bull. Câncer*, v.93, p.463-471, 2006.
- YAMADA, T.; KANEKO, H.; IZUKA K. et al. Elevation of lymphocyte and hematopoietic stem cell numbers in mice transgenic for human granulocyte CSF. *Lab. Invest.*, v. 74, p.384-394, 1996.
- WHELLER, M.B. Production of transgenic livestock: promise fulfilled. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.32-37, 2003.

Tabelas

Tabela 1. Desenvolvimento corporal de caprinos transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF dos 45 aos 285 dias de idade.

Grupo	Sexo	Peso (kg)			
		Aos 45 dias	Aos 285 dias	Ganho total	Ganho diário*
Transgênico	Macho	6,25	20,95	14,70	0,07 ± 0,05
	Fêmea	6,60	23,85	17,25	0,07 ± 0,03
Não transgênico	Macho	6,85	20,35	13,50	0,06 ± 0,03
	Fêmea	5,95	19,50	13,55	0,06 ± 0,04

*P > 0,05

Tabela 2. Contagem total e diferencial de leucócitos em caprinos jovens transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF.

Grupo	Sexo	Número de células $\times 10^3/\mu\text{L}$ (média \pm DP)					
		Leucócitos	Granulócitos			Linfócitos	Monócitos
			Neutrófilos	Basófilos	Eosinófilos		
Transgênico	Macho	27,29 \pm 12,39	21,86 \pm 12,07	0,02 \pm 0,06	0,61 \pm 1,11	4,47 \pm 1,86	0,32 \pm 0,30
	Fêmea	21,84 \pm 9,58	14,83 \pm 9,06	0,06 \pm 0,12	0,54 \pm 0,48	5,93 \pm 1,72	0,47 \pm 0,28
Não transgênico	Macho	10,99 \pm 2,27	4,79 \pm 0,85	0,07 \pm 0,06	0,52 \pm 0,76	5,32 \pm 2,11	0,29 \pm 0,18
	Fêmea	5,91 \pm 2,01	2,49 \pm 1,28	0,06 \pm 0,06	0,09 \pm 0,08	3,02 \pm 1,42	0,24 \pm 0,19
Valores de Referência*		4,0 a 13,0	1,2 a 7,2	0 a 0,12	0,05 a 0,65	2,0 a 9,0	0 a 0,55

* Kaneko et al., 1997.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos séricos de caprinos jovens transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF.

Grupo	Sexo	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Transgênico	Macho	37,00 \pm 9,44	0,85 \pm 0,21	53,50 \pm 15,36	89,17 \pm 61,25	18,67 \pm 22,29
	Fêmea	42,89 \pm 12,27	0,74 \pm 0,16	59,57 \pm 10,23	46,00 \pm 13,56	16,28 \pm 3,89
Não transgênico	Macho	40,89 \pm 17,32	0,82 \pm 0,16	55,11 \pm 16,82	97,00 \pm 28,03	28,72 \pm 18,34
	Fêmea	34,44 \pm 5,80	0,76 \pm 0,12	56,28 \pm 11,41	99,78 \pm 36,17	18,17 \pm 8,31
Valores de Referência*		21,4 a 42,8	0,7 a 1,8	50 a 75	43 a 132	15 a 52

* Boyd, 1984; Kaneko et al., 1997.

Lista de Figuras

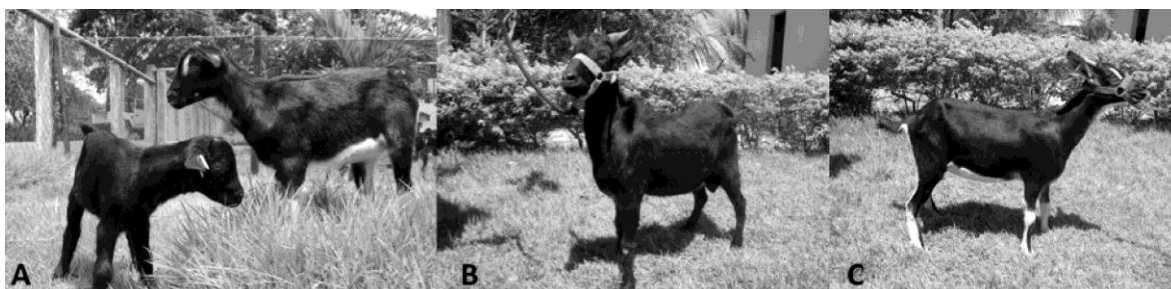


Figura 1. Caprinos transgênicos para o hG-CSF. Registro fotográfico dos animais aos 45 dias de vida (A), bem como do macho (B) e da fêmea (C) aos 285 dias de idade.

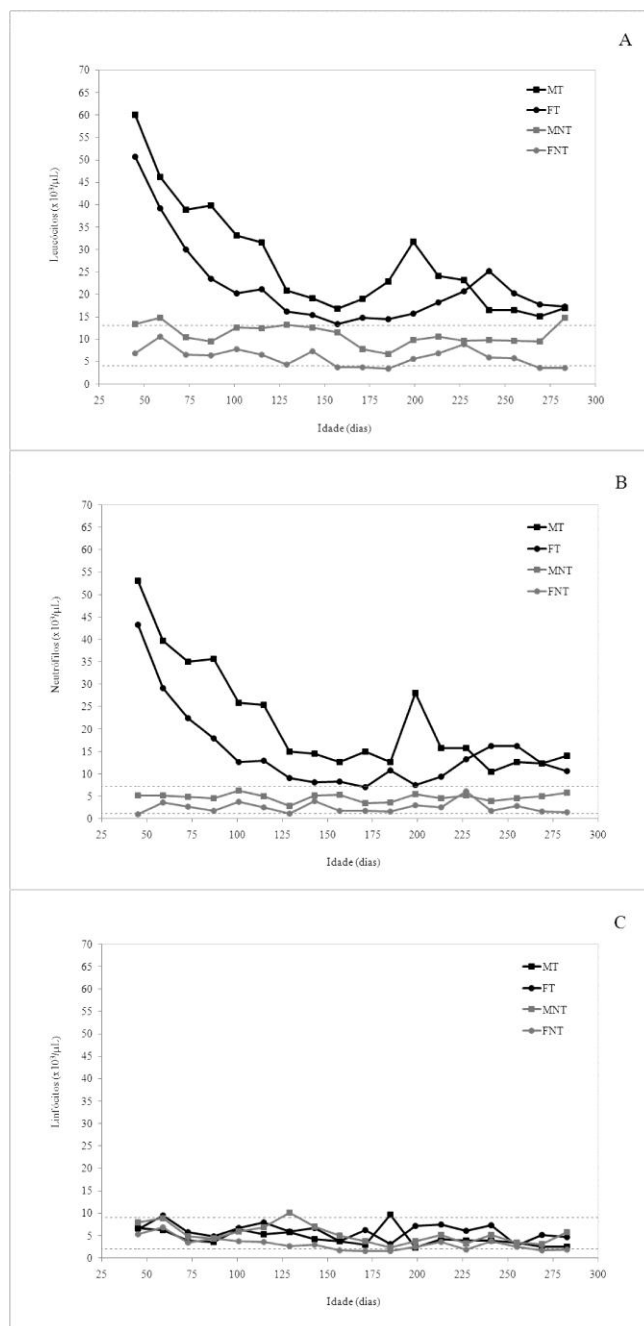


Figura 2. Perfil leucocitário de caprinos transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF dos 45 aos 285 dias de idade. As contagens de leucócitos totais (A), de neutrófilos (B) e de linfócitos (C) para o macho (MT) e a fêmea (FT) transgênicos, bem como para o macho (MNT) e a fêmea (FNT) não transgênicos estão plotadas em função da idade. As linhas tracejadas indicam a faixa de referência normal para a espécie caprina (Kaneko et al., 1997).

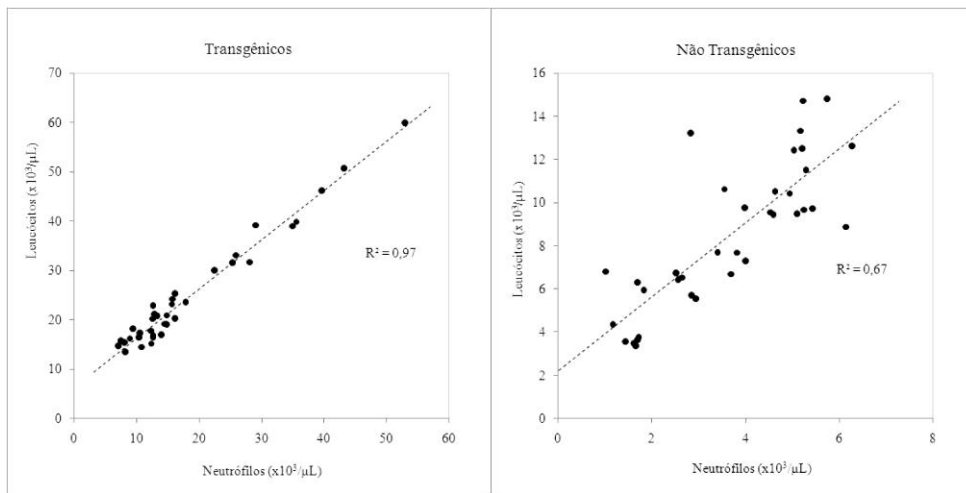


Figura 3. Correlação entre as contagens de leucócitos totais e de neutrófilos em caprinos transgênicos e não transgênicos para o hG-CSF dos 45 aos 285 dias de idade.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, verificou-se que os animais transgênicos apresentaram leucocitose marcada pela neutrofilia até os 285 dias de vida, entretanto não houve alterações nos valores absolutos das demais células da linhagem granulocítica (basófilos e eosinófilos).

Os perfis bioquímicos dos caprinos transgênicos e não transgênicos estavam dentro dos parâmetros normais para espécie indicando ausência de danos a saúde nos animais transgênicos.

Assim, outros fatores, além de uma neutrofilia extensiva, poderiam ser necessários para o desenvolvimento de uma desordem a saúde em caprinos transgênicos para o hG-CSF.

8 PERSPECTIVAS

Animais biorreatores são essenciais auxiliar a produção de substâncias, as quais possam ser aproveitadas na área farmacêutica, como matéria prima na produção de alguns produtos, como por exemplo, o hG-CSF. Assim, para que esses animais produzam proteínas recombinantes de alto valor biológico à saúde humana de uma maneira saudável, torna-se imprescindível o acompanhamento clínico e laboratorial dos fundadores para o conhecimento da causa das alterações que poderiam inviabilizar a sobrevivência dos mesmos.

A mensuração mais sensível dos níveis séricos de hG-CSF, bem como investigações adicionais envolvendo a regulação hormonal do promotor da α 1-caseína caprina, ajudarão a esclarecer esse comportamento leucocitário observado em caprinos transgênicos jovens.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAR, M.; BUHR, M. M. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 65, p. 683–690, 2006.

ASANO, S. The rationale for therapeutical use of recombinant human G-CSF. In: Yamamura Y, ed. *Recent progress in cytokine research*. Tokyo: Med Review Co., p. 135-150, 1988.

BABALOLA, C.; NIGHTINGALE, C.; NICOLAU D. Adjunctive efficacy of granulocyte colony-stimulating factor on treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in neutropenic and non-neutropenic hosts. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53(6), p.1098-1100, 2004.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote*, p. 257-261, 2004.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, v.82–83, p.255–266, 2004.

BARREDA, D.; HANINGTON, P.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 28, p. 509-554, 2004.

BEHBOODI, E.; AYRES, S. L.; MEMILI, E.; O'COIN, M.; CHEN, L. H.; REGGIO, B. C.; LANDRY, A. M.; GAVIN, W. G.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; ECHELARD, Y. Health and reproductive profiles of malaria antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells*, v. 7(2), p. 107-118, 2005.

BONEBERG, E.; HARTUG, T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflammation Research*, v. 51(3), p. 119-128, 2002.

BRACKETT, B. G.; BORANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, v. 68, 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*, v. 21, p. 157-162, 2003.

BUEHR, M.; HJORTH, J. P.; HANSER, A. K.; SANDOE, P. Genetically modified laboratory animals – What welfare problems do they face? *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 6, p. 319-338, 2003.

CARBONERO, R.; MAYORDOMO, J.; TORNAMIRA, M.; BREA, M.; RUEDA, A.; GUILLERM, V.; ARCEDIANO, A.; YUBERO, A.; RIBERA, F.; GOMES, C.; TRES, A.; PERES-GRACIA, J.; LUMBRERAS, R.; HORNEDO, J.; FUNES, H.; PAZ-ARES, L. Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized Trial. *Journal Natural Cancer Institute*, v. 93, p. 31-38, 2001.

CERASOLI, D. M.; GRIFFITHS, E. M.; DOCTOR, B. P.; SAXENA, A.; FEDORKO, J. M.; GREIG, N. H.; YU, Q. S.; HUANG, Y.; WILGUS, H.; KARATZAS, C. N.; KOPLOVITZ, I.; LENZ, D. E. *In vitro* and *in vivo* characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger. *Chemico-Biological Interactions*, v. 157-158, p. 363-365, 2005.

CHRENEK, P.; TRANDZIK, J.; MASSANYI, P.; MAKAREVICH, A.; LUKAC, N.; PESKOVICOVA, D.; PALEYANDA, R. Effect of transgeneis on reproductive traits of rabbit males. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 127-134, 2007.

CIBELLI, J. B.; STICE, S. L.; GOLUEKE, P. J.; KANE, J. J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C. Cloned transgenic calves produced from no quiescent fetal fibroblasts. *Science*, v. 280, p. 1256–1258, 1998.

DAI, Y.; VAUGHT, T. D.; BOONE, J.; CHEN, S. H.; PHELPS, C. J.; BALL, S.; MONAHAN, J. A.; JOBST, P. M.; MCCREATH, K. J.; LAMBORN, A. E.; COWELL-LUCERO, J. L.; WELLS, K. D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I. A.; AYARES, D. L. Targeted disruption of the 1,3-galactosyltransferase gene in clone pigs. *Nature Biotechnology*, v.20, p.251–255, 2002.

DENNIS, M. B. Welfare issues of genetically modified animals. *ILAR Journal*, v. 43, p. 100-109, 2002.

DUNCAN, J. J. Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Review of Science and Technology*, v. 24, p. 483-492, 2005.

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

EDMUNDS, T.; VAN PATTEN, S.M.; POLLOCK, J.; HANSON, E.; BERNASCONI, R.; HIGGINS, E.; MANAVALAN, P.; ZIOMEK, C.; MEADE, H.; McPHERSON, J.M.; COLE, E.S. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, v. 91, p. 4561-4571, 1998.

EDMUNDS, T.; VAN PATTEN, S.M.; POLLOCK, J.; HANSON, E.; BERNASCONI, R.; HIGGINS, E.; MANAVALAN, P.; ZIOMEK, C.; MEADE, H.; McPHERSON, J.M.; COLE, E.S. Recombinant human antithrombin (Atryn). *The Medical Letter on Drugs and Therapeutics*, v. 1323, p. 83-84, 2009.

EBERT, K.; SELGRATH, J. P.; DITULLIO, P.; DENMAN, J.; SMITH, T. E.; MEMON, M. A. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, p.835–838, 1991.

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

FREITAS, V. J. F. Transgênese na espécie caprina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, p. 109-115, 2003.

FREITAS, V. J. F.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; DVORYANCHIKOV, G. A.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; DIAS, L. P. B.; AVELAR, S. R. G.; MOURA, R. R.; MELO, L. M.; PEREIRA, A. F.; CAJAZEIRAS, J. B.; ANDRADE, M. L. L.; ALMEIDA, K. C.; SOUSA, F. C.; CARVALHO, A. C. C.; SEROV, O. L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.79, p. 585–592, 2007.

FREITAS, V. J. F.; TEIXEIRA, D. I. A.; MELO, L. M.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; MOURA, R. R.; PEREIRA, A. F.; SOUSA, F. C.; ALMEIDA, K. C.; AVELAR, S. R. G.; CAJAZEIRAS, J. B.; DIAS, L. P. B.; DYORYANCHIKOV, G. A.; ANDREEVA, L. E.; SEROVA, I. A.; SEROV, O. L. Generation of transgenic naturalized goats producing granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) in Brazil, *Transgenic Research*, v. 19, p. 146, 2010.

GANDOLFI, F.; TERQUI, M.; MODINA, S.; BREVINI, T. A. L.; AJMONE-MARSAN, P.; FOULON-GAUZE, F.; COUROT, M. Failure to produce transgenic offspring by intra-tubal insemination of gilts with DNA treated sperm. *Reproduction, Fertility and Development*, v.8, p. 1055–1060, 1996.

GILES, J. R. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. *Molecular Reproduction and Development*, v. 36, p. 130-138, 1993.

GOOTWINE, E.; BARASH, I.; BOR, A.; DEKEL, I.; FRIEDLER, A.; HELLER, M.; ZAHARONI, U.; ZENUE, A.; SHANI, M. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology*, v. 48, p. 485-499, 1997.

GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings National Academy of Science U S A*, v. 77, p. 7380-7384, 1980.

GOUGH, A.; CLAPPERTON, M.; ROLANDO, N.; FOSTER, A. V.; PHILPOTT-HOWARD, J.; EDMONDS, M. E. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet*, v. 350(9081), p. 855-859, 1997.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E. JR.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, v. 315, p.680-683, 1985.

HANADA, T.; ONO, I. Disappearance of neutrophil ascillation in a child with cyclic neutropenia after treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *European Journal of Haematology*, v. 45, p. 181-182, 1990.

HARADA, M.; QIN, Y.; TAKANO, H.; MINAMINO, T.; ZOU, Y.; TOKO, H. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jack-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nature Medicine*, v. 11(3), p. 305-311, 2005.

HARTUNG, T.; AULOCK, S.; WENDEL, A. Role of granulocyte colony –stimulating factor in infection and inflammation. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 187(2), p. 61-69, 1998.

HILL, C.; OSSLUND, T.; EISENBER, G. D. The structure of granulocyte colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Biochemistry*, v. 90, p. 5167-5171, 1993.

HOUDEBINE, L. M. La transgênese animale et ses applications. *INRA Productions Animales*, v. 11, p. 81-94, 1998.

HOUDEBINE, L. M. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research*, v. 9, p. 305-312, 2000.

HOUDEBINE, L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, p. 269-281, 2005.

HOUDEBINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 32, p. 107-121, 2009.

HUANG, S. Z.; HUANG, Y.; CHEN, M. J.; ZENG, F. Y.; REN, Z. R.; ZENG, Y. T. Selection of *in vitro* produced, transgenic embryos by nested PCR for efficient production of transgenic goats. *Theriogenology*, v. 56, p. 545-556, 2001.

HÜTTMANN, A.; SCHIRSAFI, K.; SEEBER, S.; BOIKO, P. Comparison of lenograstim and filgrastim: effects on blood cell recovery after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 131, p. 152-156, 2005.

IWASAKI, S. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 545-556, 2001.

JACKSON, K. A.; BERG, J. M.; MURRAY, J. D.; MAGA, E. A. Evaluating the fitness of human lysozyme transgenic dairy goats: growth and reproductive traits. *Transgenic Research*, DOI 10.1007/s11248-010-9371-z, 2010.

JAENISCH, R.; MINTZ, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings National Academy of Sciences U S A*, v. 71, p. 1250-1254, 1974.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.

KARATZAS, C. N.; ZHOU, F. J.; HUANG, Y.; DUGUAY, F., CHRETIEN, N.; BHATIA, B.; BILODEAU, A. S.; KEYSTON, R.; TAO, T.; KEEFER, C. L.; WANG, B.; BALDASSARRE, H.; LAZARIS, A. Production of recombinant spider silk (BioSteel®) in the milk of transgenic animals. *Transgenic Research*, v. 8, p. 476-477, 1999.

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

KIM, M. O.; KIM, S. H.; LEE, S. R.; KIM, K. S.; LEE, H. T.; KIM, S. J.; RYOO, Z. Y. Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) into mouse urine. *Life Science*. v. 78, p. 1003-1009, 2006.

KO, J. H.; LEE, C-S.; KIM, K. H.; PANG, M-G.; KOO, J. S.; FANG, N.; KOO, D-B.; OH, K. B.; YOUN, W-S.; ZHENG, G. D.; PARK, J. S.; KIM, S. J.; HAN, Y-M.; CHOI, I. Y.; LIM, J.; SHIN, S. T.; JIN, S. W.; LEE, K-K.; YOO, O. J. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Research*, v. 9, p. 215-222, 2000.

KRIMPENFORT, P.; RADEMAKERS, A.; EYESTONE, W.; VAN DER SCHANS, A.; VAN DEN BROEK, S.; KOOIMAN, P. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology*, v.9, p. 844–847, 1991.

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

KURITZES, D. R.; PARENTI, D.; WARD, D. J.; RACHLIS, A.; WONG, R. J.; MALLON, K. P. Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial. *Aids*, v. 12(1), p. 65-74, 1998.

LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V.M.; DOLCI, S.; FARACE, M. G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, v.57, p. 717–723, 1989.

LAWRENCE, T. L. J.; FOWLER, V. R. Growth of farm animals. CABI Publishing, Wallingford, 1997.

LEE, C. S.; FANG, N. Z.; KOO, D. B.; LEE, Y. S.; ZHENG, G. D.; OH, K. B.; YOUN, W. S.; HAN, Y. M.; KIM, S. J.; SHIN, S. T.; JIN, S. W.; LEE, K. S.; KO, J. H.; KOO, J. S.; PARK, C. S.; LEE, K. S.; YOO, O. J.; LEE, K. K. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegragus*. *Small Ruminant Research*, v.37, p. 57-63, 2000.

LU, H. S.; BOONE, T. C.; SOUZA, L. M.; LAI, P. H.. Disulfide and secondary structure of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 268(1), p. 81-92, 1989.

MAGA, E. A.; MURRAY, J. D. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology*, v. 13, p. 1452-1457, 1995.

MAGA, E. A.; CULLOR, J. S.; SMITH, W.; ANDERSON, G. B.; MURRAY, J. D. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 3(4), p. 384-392, 2006.

MAIONE, B.; LAVITRANO, M.; SPADAFORA, C.; KIESSLING, A. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Molecular Reproduction Development*, v.50, 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 National Academy of Sciences USA*, v. 78, p. 7634-7638, 1981.

MERTENS, C.; RULICKE, T. Welfare assessment and phenotype characterization of transgenic mice. *ALTEX*, v. 24, p. 46-48, 2007.

MONTALDO, H. Genetic engineering applications in animal breeding. *Electronic Journal Biotechnology*, v. 9, n. 2, 2006.

MOURA, R. R.; LOPES-JUNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F. Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats for DNA microinjection. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45 p. 101-106, 2010.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic farm animals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 762-770, 2007.

OHNO, R.; TOMONAGA, M.; KOBAYASHI, T.; KANAMURA, A.; SHIRAKAWA, S.; MASAOKA, T.; OMINE, M.; OH, H.; NOMURA, T.; SAKAI, Y.; HIRANO, M.; YOKOMAKU, S.; NAKAYAMA, S.; YOSHIDA, Y.; MIURA, A. B.; MORISHIMA, Y.; DOHY, H.; NIHO, Y.; HAMAJIMA, N.; TAKAKU, F. Effect of granulocyte colony-stimulating factor after intensive induction therapy in relapsed or refractory acute leukemia. *The New England Journal of Medicine*, v. 323, p. 871-877, 1991.

PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD, M. G.; BIRNBERG, N. C.; EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Biotechnology*, v.24, p.429-433, 1982.

PARKER, M. H.; BIRCK-WILSON, E.; ALLARD, G.; MASIELLO, N.; DAY, M.; MURPHY, K. P.; PARAGAS, V.; SILVER, S.; MOODY, M. D. Purification and characterization of recombinant version of human alpha-fetoprotein expressed in the milk of transgenic goats. *Protein Expression and Purification*, v. 38, p. 177-183, 2004.

PEREZ, A.; SOLANO, R.; CASTRO, R.; LLEONART, R.; DE ARMAS, R.; MARTINEZ, R.; AGUILAR, A.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. Sperm cells mediated gene transfer in cattle. *Biotechnology*, v. 8, p. 90–94, 1991.

PESQUEIRO, J. B.; MAGALHÃES, L. E.; BAPTISTA, E. H.; SABATINI, R. A. Animais transgênicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 27, p. 52-56, 2002.

POLLOCK, D. P.; KUTZKO, J. P.; BIRCK-WILSON, E.; WILLIAMS, J. L.; ECHELARD, Y.; MEADE, H. M. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *Journal of Immunological Methods*, v. 231, p. 147-157, 2000.

PURSEL, V. G.; HAMMER, R.E.; BOLT, D. J.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 41, p. 77-87, 1990.

PURSEL, V. G.; WALL, R. J.; SOLOMON, M. B.; BOLT, D. J.; MURRAY, J. E.; WARD, K. A. Transfer of an ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion gene into swine. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 2208-2214, 1997.

REGGIO, B. C; JAMES, A. N.; GREEN, H. L.; GAVIN, W. G; BEHBOODI, E.; ECHELARD, Y.; GODKE, R. A. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1528–1533, 2001.

RICHT, J. A.; KASINATHAN, P.; HAMIR, A. N.; CASTILLA, J.; SATHIYASEELAN, T.; VARGAS, F.; SATHIYASEELAN, J.; WU, H.; MATSUSHITA, H.; KOSTER, J.; KATO, S.; ISHIDA, I.; SOTO, C.; ROBL, J. M.; KUROIWA, Y. Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology*, v. 25, p. 132-138, 2006.

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

SERIZAWA, I.; AMANO, K.; ISHII, H.; ICHIKAWA, T.; KUSAKA, M.; TAGUCHI, O.; KIYOKAWA, N.; FUJIMOTO, J. Long-term overexpression of human granulocyte colony-stimulating factor in transgenic mice: persistent neutrophilia with no increased mortality for more than one year. *Cytokine*, v. 12, p. 630-635, 2000.

SPERANDIO, S.; LULLI, V.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MAIDONE, B.; SPADAFORA, C.; LAVITRANO, M. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Animal Biotechnology*, v.7, p.59–77, 1996.

VAN REENEN, C. G. Assessing the welfare of transgenic farm animals. In: ENGELHARD, M.; HAGEN, K.; BOYSEN, M. (eds) *Genetic Engineering in Livestock, new applications and interdisciplinary perspectives*. Springer, Berlin, p. 119-143, 2009.

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

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

WELLS, D. J.; PLAYLE, L. C.; ENSER, W. E. J.; FLECKNELL, P. A.; GARDINER, M. A.; HOLLAND, J.; HOWARD, B. R.; HUBRECHT, R.; HUMPHREYS, K. R.; JACKSON, I. J.; LANE, N.; MACONOCHE, M.; MASON, G.; MORTON, D. B.; RAYMOND, R.; ROBINSON, V.; SMITH, J. A.; WATT, N. Assessing the welfare of genetically altered mice. *Laboratory Animals*, v. 40, p. 111-114, 2006.

WHEELER, M. B. Development and validation of swine embryonic stem cells : a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 6, p. 563-568, 1994.

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

WITTMAN, B.; HORAN, J.; LYMAN, G. H. Prophylactic colony-stimulating factor in children receiving myelosuppressive chemotherapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer treatment reviews*, v. 32(4), p. 289-303, 2006.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A

RESUMO PUBLICADO: Persistent neutrophilia in clinically healthful hG-CSF-transgenic goats in Brazil

UC Davis Transgenic Animal Research Conference VII
Granlibakken Conference Center
August 17 – 21, 2009, Tahoe City, California

- MELO, L. M.; RODRIGUES, V. H. V.; MOURA, R. R.; ALCÂNTARA NETO, A. S.; PEREIRA, A. F.; ALBUQUERQUE, E. S.; MELO, C. H. S.; ANDREEVA, L. E.; SEROVA, I. A.; PINHEIRO, D. C. S. N.; FREITAS, V. J. F. Persistent neutrophilia in clinically healthful hG-CSF-transgenic goats in Brazil. *Transgenic Research*, v. 19, p. 146-147, 2010.

Persistent neutrophilia in clinically healthful hG-CSF-transgenic goats in Brazil

V.H.V. Rodrigues¹, R.R. Moura¹, A.S. Alcântara Neto¹, A.F. Pereira¹, L.M. Melo¹, D.C.S.N. Pinheiro¹ & V.J.F. Freitas*¹

¹ *Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza- CE, Brazil*

Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) has been the most widely used hematopoietic growth factor due to its proven efficacy against different forms of neutropenia, chemotherapy-induced leucopenia, and in the mobilization of progenitor cells for autologous or allogenic transplantation. Our group obtained a male (TM) and a female (TF) transgenic goats harboring goat α s1-casein promoter/hG-CSF. Transgenic and non-transgenic goats from a naturalized Brazilian breed, named Caninde, were submitted to hematological and blood chemical examinations up to 9.4 month-of-age. On 1.5 month and biweekly thereafter blood samples were collected by venipuncture for hematological evaluation and for serum biochemistry analysis. Total (WBC) and differential white blood cell counts were determined by CELL-DYN 3700 analyzer. Urea, creatinine, glucose and the enzymes AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) and LDH (Lactate dehydrogenase) were measured by BT 3000 plus analyzer. The cell counts were presented as mean \pm SEM and were qualitatively compared with normal reference values for goats. Non-transgenic goats presented a WBC count (8.45 ± 0.56 K/ μ L) within the normal range for the species, while for transgenic goats the value was almost 3-fold increased (24.57 ± 1.88 K/ μ L). This leukocytosis was produced by the elevated number of neutrophils (18.35 ± 1.85 K/ μ L), without changes in other cell granulocytic and non-granulocytic counts. Strikingly, increased neutrophil counts were seen in transgenic goats before they reached 5.2-month-old and the highest values occurred at 1.5 month-of-age (53.0 K/ μ L and 43.2 K/ μ L for TM and TF, respectively). Although the average values have decreased to 14.94 ± 1.56 K/ μ L and 11.18 ± 1.04 K/ μ L, for TM and TF, respectively, the neutrophilia persisted until 9.4 month-of-age. The serum biochemistry profiles of transgenic and non-transgenic goats were within the normal ranges for the species. These findings indicated normal liver and renal functions and the absence of general health disorders. In conclusion, young transgenic goats presented neutrophilia, especially before five month-of-age, and remained clinically healthful. Factors other than extensive neutrophilia could be required for the development of health disorders in hG-CSF transgenic goats.

APÊNDICE B

RESUMO PUBLICADO: Caprinos transgênicos para o hG-CSF com alteração no perfil leucocitário

Universidade Estadual do Ceará – UECE
XIV Semana Universitária/ Encontro de Iniciação Científica e
Encontro de Pesquisadores
9 a 13 de novembro de 2009, Fortaleza, CE

Caprinos transgênicos para o hG-CSF com alteração no perfil leucocitário

Rodrigues, V.H.V.; Moura, R.R.; Alcântara Neto, A.S.; Pereira, A.F.; Pinheiro, D.C.S.N.;
Melo, L.M.; Freitas, V.J.F.

Animais de produção transgênicos secretando proteínas de interesse terapêutico em seu leite são importantes para atender uma demanda em diversos medicamentos de uso humano. No entanto, é importante conhecer as diversas condições que o transgene possa adicionar aos animais geneticamente modificados. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os parâmetros leucocitários e bioquímicos em caprinos transgênicos para o fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (hG-CSF) e seus respectivos controles (caprinos não transgênicos). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (parecer nº 12/2005) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CQB nº 0228/2006). Amostras de sangue dos animais experimentais (dois transgênicos e dois não transgênicos de ambos os sexos) foram colhidas quinzenalmente, de 1,5 até 9,4 meses de idade, para posteriores exames hematológicos e bioquímicos. A contagem total e diferencial das células brancas do sangue foi determinada pelo CELL-DYN 3700 analyzer (Abbott Park, Illinois, EUA), enquanto que uréia, creatinina, glicemia e enzimas (LDH, AST, ALT) foram mensuradas pelo uso do BT 3000 PLUS analyzer (Winer Lab, Rosário, Argentina). Adicionalmente, foi realizado acompanhamento clínico e pesagens semanais. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e comparados aos valores normais para a espécie caprina. Os caprinos não transgênicos apresentaram contagem das células brancas do sangue ($8,45 \pm 0,56$ k/ μ L) dentro do padrão normal para a espécie, enquanto os transgênicos apresentaram um valor quase três vezes maior ($24,57 \pm 1,88$ k/ μ L). Esta leucocitose deveu-se ao elevado número de neutrófilos ($18,35 \pm 1,85$ k/ μ L), sem alterações na contagem das outras células da linhagem granulocítica e não granulocítica. Os valores mais elevados para o número de neutrófilos foram observados nos caprinos transgênicos ao início do experimento ($53,0$ k/ μ L e $43,2$ k/ μ L para macho transgênico-MT e a fêmea transgênica-FT, respectivamente). A partir dos 5,2 meses de idade, estes valores diminuíram para $14,94 \pm 1,56$ k/ μ L (MT) e $11,18 \pm 1,04$ k/ μ L (FT), entretanto a neutrofilia persistiu até ao final do experimento. Os perfis bioquímicos do soro dos animais transgênicos e não transgênicos encontraram-se nos valores normais para a espécie, sugerindo que as funções hepáticas e renais apresentavam-se normais. Além disso, não foram observadas alterações clínicas nos animais durante todo o estudo. Do nascimento até 9,4 meses, os animais transgênicos apresentaram peso corpóreo semelhante ao dos não transgênicos. Em conclusão, os caprinos transgênicos jovens apresentaram neutrofilia, especialmente antes dos cinco meses de idade e mantiveram-se clinicamente saudáveis. Excluindo a neutrofilia, não foram observados outros fatores que pudessem desenvolver distúrbios na saúde dos caprinos transgênicos para o hG-CSF.