

Engenharia genética em suínos: aplicações, metodologias e perspectivas futuras

Genetically engineered pigs: applications, methods and future prospects

SILVA, Zigomar da¹; SOUZA, Andressa Pereira de^{1,2},
LIMA-ROSA, Carlos André da Veiga³; PANDOLFI, José Rodrigo Cláudio⁴;
FONSECA, Francisco Noé da⁴; MARQUES, Mariana Groke^{4*}

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, SC, Brasil.

² Faculdade Concórdia, Concórdia, SC, Brasil.

³ Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior da Região Sul, Laguna, SC, Brasil.

⁴ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa em Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

* E-mail para correspondência: mariana.marques@embrapa.br

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo revisar os principais conceitos da engenharia genética em suínos, abrangendo seus aspectos históricos, suas aplicações, as diferentes metodologias, bem como a abordagem da utilização de novas ferramentas de edição gênica. Os suínos geneticamente modificados têm grande importância e se justifica pelas suas aplicações tanto na produção animal quanto na biomedicina. Várias são as metodologias disponíveis para a modificação genética em suínos, variando em aplicabilidade e eficiência. Embora várias técnicas possam ser empregadas em suínos, algumas não permitem alcançar altas taxas de sucesso, enquanto outras são mais promissoras. Além disso, as atuais ferramentas de edição gênica podem ser utilizadas para aprimorar significativamente a transgenia em suínos. Contudo, a metodologia a ser aplicada deve estar ajustada às condições laboratoriais e aos objetivos da modificação genética pretendida.

Palavras-chave: biotecnologia, engenharia genética, suinocultura, transferência gênica.

ABSTRACT

The present paper aims to review the main concepts of genetic engineering in pigs, covering its historical aspects, its applications, the different methodologies, as well as addressing the use of new genetic editing tools. The genetic engineering in pigs is very important and are justified for their applications, for both use in the pig husbandry and biomedical research. There are several methodologies available for the genetic modifications in pigs, which are variable in their applicability and efficiency. Although several techniques can be employed in pigs, some not achieve high success rates, while others are more promising. In addition, current genome-editing tools it is in use to improve significantly genetic engineering in pigs. However, the methodology must adapt to the laboratory conditions and the objectives of the intended genetic modification.

Keywords: biotechnology, gene transfer, genetic engineering, pig husbandry.

INTRODUÇÃO

A engenharia genética permite várias formas de suínos geneticamente modificados, sendo a transgenia a mais conhecida das modificações genéticas, que consiste na inserção de um ou mais genes (transgene) de uma espécie no genoma de outra espécie. Um animal transgênico expressa uma característica biológica que era exclusiva da espécie a qual o transgene foi obtido (GORDON & RUDDLE, 1981). A edição genica permite a substituição de um ou mais nucleotídeos em determinado gene (CEASAR *et al.*, 2016), desta forma alterando sua função ou intensidade de expressão.

Nos primeiros trabalhos de modificação genética em animais, os estudos eram utilizados em biologia molecular, para o estudo da função gênica, e em virologia, para o estudo dos mecanismos de infecção viral (BRACKETT *et al.*, 1971; JAENISCH & MINTZ, 1974). Posteriormente, percebeu-se que esta manipulação genética podia ser usada como valiosa biotecnologia para a produção de animais com características genéticas únicas, tão desejadas pelos melhoristas e de difícil alcance pelos métodos convencionais de melhoramento genético animal (PINKERT, 2004).

A transgenia foi utilizada precocemente na espécie suína, logo após a padronização da primeira técnica de transfecção, a microinjeção pronuclear de DNA (PMI) (HAMMER *et al.*, 1985). Após

isso, outras metodologias para produção de suínos geneticamente modificados veem sendo desenvolvidas como a transgenia mediada por espermatozoide (SMGT), a clonagem por transferência nuclear de células somáticas associada a transgenia (SCNT-MGT), a eletroporação entre outras (AREZZO, 1989; LAVITRANO *et al.*, 1989; HORAN *et al.*, 1992; SCHNIEKE *et al.*, 1997). Tão logo quanto surgiram, esses métodos começaram a ser empregados para a produção de suínos transgênicos (HORAN *et al.*, 1992). Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de edição gênica, como o sistema CRISPR/Cas, e a sua utilização associada aos métodos tradicionais, podem aumentar significativamente a eficiência da transgenia e demais aplicações da engenharia genética em suínos.

Diante do exposto, o objetivo deste artigo foi, por meio de levantamento bibliográfico, revisar os principais conceitos da engenharia genética em suínos, abrangendo seus aspectos históricos, suas aplicações, as diferentes metodologias, bem como a abordagem da utilização de novas ferramentas de edição gênica.

APLICAÇÕES DOS SUÍNOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

A produção de suínos transgênicos é destinada a duas principais finalidades: produção de animais como fonte alimentar e na pesquisa biomédica. Na suinocultura, bem

como na pecuária em geral, a transgenia pode ser grande aliada à seleção genética clássica, pois consegue alterar uma característica genética específica de forma dirigida (PINKERT, 2004). Isso possibilita melhorias na produção zootécnica destes, mas o alto custo desta tecnologia tem limitado a sua aplicação (WALL, 1996).

Através desta biotécnica, podem-se transferir genes responsáveis por características de interesse econômico para animais geneticamente superiores, ou ainda genes de outras espécies, tornando estes suínos diferenciados. Neste sentido, foram produzidos suínos mais ecológicos, com reduzido o teor de fósforo excretado em suas fezes, o qual é poluente ambiental. Estes animais expressam na saliva o gene da enzima fitase, que é encontrado em *Escherichia coli*, permitindo que estes animais digerissem o fosforo fornecido na dieta, reduzindo em 75% a excreção fecal deste mineral (GOLOVAN *et al.*, 2001). A resistência frente à exposição de patógenos é outra possibilidade desta biotecnologia. A febre aftosa é uma doença viral, de grande impacto econômico que acomete esta espécie. Suínos transgênicos expressando *small hairpin* RNA contra a estrutura do capsídeo viral possibilitou a estes animais uma menor susceptibilidade à esta enfermidade (HU *et al.*, 2015).

A carne suína é a mais consumida em todo mundo, devido, entre outros motivos, a sua qualidade. Entre as características de uma carne de qualidade, o marmoreio é o que dá à

carne maciez, tornando a mais apreciada pelos consumidores (BREWER *et al.*, 2001). Pensado nisso, suínos com carne contendo maior proporção de gordura intramuscular (marmoreio) também já foram obtidos por transgenia. Estes eram portadores do gene da proteína contendo o domínio 1 de interação com a fosfotirosina (PID1), que codifica uma proteína que promove o acúmulo de gordura entre a musculatura (FANG *et al.*, 2017). Além disso, estes animais podem ser utilizados em biomedicina, como animais modelos para o estudo de doenças do metabolismo e da deposição de lipídios em humanos (FANG *et al.*, 2017).

Na pesquisa biomédica, os suínos são excelentes modelos, pois, em muitos aspectos anatômicos e fisiológicos apresentam semelhanças aos humanos (GUTIERREZ *et al.*, 2015). Como modelos animais para doenças humanas, estes animais podem expressar o fenótipo da doença de forma muito semelhante ao que acontece em humanos e serem utilizados nos estudos de fisiopatologia ou terapêutica. São várias as doenças que podem ser reproduzidas em suínos como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus entre outras (PERLEBERG *et al.*, 2018).

Outra possibilidade de produção de suínos geneticamente modificados é o desenvolvimento de órgão e tecidos para xenotransplante, ou seja, o uso de tecidos e possivelmente de órgãos de animais no transplante para humanos. A falta de

compatibilidade imunológica entre o animal e o humano acarretava o insucesso do xenotransplante (LAZZERESCHI *et al.*, 2000). No entanto, com a descoberta da via imunológica da rejeição, esta passou a ser alterada em animais transgênicos (LAVITRANO *et al.*, 1997).

Exemplo disso é a expressão, em suínos transgênicos, de CD59, em combinação com a proteína cofator de membrana humana (hMCP, *human membrane cofactor protein*) e o fator acelerador da decomposição humano (hDAF, *human decay-accelerating factor*) (ZHOU *et al.*, 2005), tornando estes animais possíveis fontes de tecidos para uso em xenotransplante. O hDAF também foi expresso em animais produzidos em vários outros estudos, sendo expresso em vários órgão e tecidos (LAVITRANO *et al.*, 1999; CAPPELLO *et al.*, 2000; LAZZERESCHI *et al.*, 2000; VARGIOLU *et al.*, 2010).

Outra aplicação biomédica é a inserção de genes que codificam proteínas de interesse terapêutico, permitindo que estes animais transgênicos secretem biofarmacos em grandes quantidades, transformando-os nos chamados animais biorreatores (WHITELAW *et al.*, 1999). Exemplos de biofármacos produzidos a partir de suínos geneticamente modificados são o fator VIII de coagulação humano (PALEYANDA *et al.*, 1997) e a proteína C humana (VAN COTT *et al.*, 2001).

METODOLOGIAS PARA A PRODUÇÃO DE SUÍNOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Existem várias metodologias para a geração de modificações genéticas em suínos, as quais empregam diferentes formas de transfecção, diferenciando-se na forma em que o eDNA é entregue no interior da célula. Algumas destas metodologias são onerosas e exigem profissional com alto treinamento, enquanto existem protocolos que utilizam mecanismos próprios da célula, tornando-os de aplicação mais simples.

O primeiro suíno transgênico foi produzido através da PMI de DNA (HAMMER *et al.*, 1985). Esta técnica consiste em inserir de forma mecânica o material genético exógeno dentro do pronúcleo de zigotos, sendo esta técnica desenvolvida inicialmente para a produção de camundongos transgênicos (GORDON *et al.*, 1980). A PMI, quando aplicada em animais de laboratórios, como ratos e camundongos, possui eficiência em torno de 30%, mas animais pecuários, sua eficácia fica em torno de 1–4% (UCHIDA *et al.*, 2001; LAVITRANO *et al.*, 2003), com alguns trabalhos em suínos alcançando 8% a 28,6% de sucesso (CHOU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014). Em suínos, a principal dificuldade se dá pela opacidade do oócito, o que torna a visualização do seu pronúcleo difícil, requerendo que sejam centrifugados antes da microinjeção (HAMMER *et al.*, 1985), o que

torna a técnica onerosa, pois exige equipamentos avançados e pessoal altamente capacitado, além dos resultados variáveis de sucesso, principalmente devido a excessiva manipulação que pode levar a perdas embrionárias (LAVITRANO *et al.*, 2003).

A transferência nuclear de células somáticas previamente modificadas geneticamente (SCNT-MGT, do inglês: *Somatic cell nuclear-transfer mediated gene-transfer*) atualmente é a técnica mais utilizada para a produção de suínos geneticamente modificados. Para a SCNT-MGT inicialmente cultivam-se células, geralmente fibroblastos fetais, as quais são transfectadas, selecionadas quanto a expressão do plasmídeo e posteriormente fundidas aos oócitos enucleados, resultando em animais transgênicos clonados (LI *et al.*, 2009). Este método é pouco eficiente, devido à excessiva manipulação, resultando em baixas taxas de sucesso, com 1,3% (LU *et al.*, 2015) a 2% (WU *et al.*, 2013), podendo alcançar pouco mais de 7% (HYUN *et al.*, 2003). Apesar do baixo número de animais gerados, o amplo uso da técnica se dá pelo alto índice de sucesso na expressão do transgene, por ser possível a seleção prévia das células que estejam expressando o eDNA.

Os vírus da família Retroviridae, devido à capacidade de integrarem seu genoma ao do hospedeiro, têm sido aplicados como vetores para a transgenia. O vírus da anemia infecciosa equina foi utilizado como vetor, sendo microinjetados em oócitos, o que

permitiu obter suínos transgênicos expressando proteína verde fluorescente melhorada (eGFP, do inglês, *enhanced Green Fluorescent Protein*) com 29% de sucesso (WHITELAW *et al.*, 2004). Vetores retrovirais também foram empregados na transfecção de oócitos e espermatozoides suínos com 22,22% e 10,17% de animais transgênicos nascidos, respectivamente, ambos expressando eGFP (CABOT *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2012).

A transformação genética mediada pelos testículos (TMGT, do inglês *Testis Mediated Gene Transfer*) é empregada *in vivo*. O eDNA é aplicado por injeção nos túbulos seminíferos, transfectando assim as células germinativas, com o animal passando a produzir espermatozoides contendo o gene de interesse (CHEN *et al.*, 2006). Para suínos a utilização desta técnica resultou, em média, 19,57% túbulos seminíferos contendo células germinativas expressando o gene bacteriano da enzima β -galactosidase (LacZ) (KIM *et al.*, 1997).

A transgenia mediada por espermatozoide ou SMGT baseia-se na capacidade que o espermatozoide possui em captar e internalizar eDNA. Esta foi relatada pela primeira vez por Brackett *et al.* (1971). Os autores observaram que quando partículas do Vírus de Símios 40 (SV40) eram incubadas com espermatozoides, eram internalizadas e se integravam ao genoma espermático, sendo carreadas ao oócito no momento da fecundação. À época, esta

descoberta não foi percebida como metodologia para a produção de animais transgênicos. No entanto, em 1989, dois artigos isolados foram publicados relatando a SMGT em ouriços-do-mar (AREZZO, 1989) e em ratos (LAVITRANO *et al.*, 1989), marcando o início propriamente dito desta metodologia.

A SMGT utiliza mecanismos moleculares próprios do espermatozoide para realizar a internalização de eDNA. Para que o eDNA consiga ultrapassar a membrana citoplasmática inicialmente ele se liga em moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHCII) (KAUFMAN *et al.*, 1984; LAVITRANO *et al.*, 1997). A seguir, o eDNA atravessa a membrana citoplasmática e se liga a proteínas do Grupamento ou Cluster de Diferenciação do tipo 4 (CD4), presentes na face intracelular da membrana, sendo posteriormente carreado para o interior do núcleo espermático com auxílio do CD4 (LAVITRANO *et al.*, 1992; ZANI *et al.*, 1995; LAVITRANO *et al.*, 1997).

Os espermatozoides utilizados na SMGT devem ser separados do plasma seminal, por este conter o Fator Inibitório-1 (IF-1, do inglês *Inhibitory Factor-1*), que são proteínas que bloqueiam a entrada de eDNA nos espermatozoides (LAVITRANO *et al.*, 1992; LAVITRANO *et al.*, 2003). A lavagem dos espermatozoides, para a remoção do IF1, é dos primeiros passos da SMGT, pois amplia

a captação de moléculas de eDNA pelos espermatozoides (LAVITRANO *et al.*, 2003).

A SMGT é uma boa alternativa para a produção de animais transgênicos, principalmente nas espécies as quais a microinjeção não é factível. Além disso, é uma técnica mais barata, pois não há a necessidade de equipamentos dispendiosos. Sua eficiência é outro ponto favorável, pois pode ultrapassar os 80% de sucesso (LAVITRANO *et al.*, 2003). Ainda, diversas modificações na técnica podem ser feitas para tentar melhorar os índices de transgenia. A exemplo, pode-se aumentar a efetividade na concepção de animais transgênicos pela utilização usando a ICSI-MGT, ou seja, injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês *Intracitoplasmatic Sperm Injection*) previamente transfectados (PEREYRA-BONNET *et al.*, 2008).

Outra forma de melhorar a eficiência da SMGT é a utilização de métodos auxiliares de transfecção. Estes métodos podem ser físicos, como a eletroporação. Neste caso, as células e o eDNA de interesse são colocados em um meio, onde se aplica uma corrente elétrica com potência e tempo suficientes para que o eDNA adentre a célula (KUMAR PRAMOD *et al.*, 2016). A eletroporação de espermatozoides suínos utilizando alta voltagem (não especificada) aplicada por 2,4 segundos incrementou em 5-10% a taxa de transfecção comparado com o grupo controle (HORAN *et al.*, 1992). Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, foram obtidas taxas

de transfecção de $36,7 \pm 2,78\%$, o que foi mais de duas vezes superior ao grupo controle, no qual foi utilizado a incubação dos espermatozoides com o eDNA purificado, quando utilizou-se uma corrente elétrica de 500 volts, por $500\mu\text{s}$ e dois pulsos (DA SILVA *et al.*, 2018). A eletroporação, no entanto, pode ser danosa aos espermatozoides, podendo causar redução na motilidade espermática, além de diminuir as taxas de fertilização, nascimento, transferência gênica e anormalidades embrionárias (TSAI, 2000).

Já os métodos químicos consistem na utilização de agentes que, ou permeabilizam ou transpõe a membrana citoplasmática. A polifecção é técnica que utiliza polímeros catiônicos, como a polietilenoimina (PEI). A PEI, por possuir grupos amina protonáveis, é capaz de complexar por interação eletrostática ao eDNA (que possui carga negativa) formando complexos PEI-DNA, também chamados de poliplexos (BIEBER *et al.*, 2002). Estes ligam-se à superfície celular e são internalizados por endocitose. Uma vez no interior das células, migram para núcleo, onde o eDNA é liberado (GODBEY & MIKOS, 2001). Em espermatozoides suínos, utilizando-se nanopartículas magnéticas revestidas com PEI, obtiveram-se suínos transgênicos para o gene PID1 com 29,16% de eficiência (FANG *et al.*, 2017). A PEI *per se*, foi utilizada pelo nosso grupo de pesquisa, obtendo-se $76,8 \pm 3,09\%$ de eficiência transfecção de espermatozoides suínos após 10 minutos de incubação, utilizando 0,5

mg/mL de PEI, o que foi 4,3 vezes superior ao grupo controle. Neste trabalho, encontramos que a polifecção causou danos ao acrossoma e a membrana plasmática, devido a isso, é recomendável que os espermatozoides transfectados por este método sejam utilizados em associação a outras biotécnicas como a fertilização *in vitro* ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Consoante ao aumento na eficiência da biotecnologia, a precisão da inserção do eDNA de interesse é de extrema relevância para permitir a correta expressão do gene de interesse e conseguir o fenótipo desejado. Em face a isso, o sistema CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein) descoberto por Mojica *et al.* (1993) tem trazido inestimáveis avanços para a engenharia genética pela utilização do CRISPR/Cas9 como ferramenta para a edição gênica, devido a sua precisão na inserção de novas sequências de nucleotídeos (JINEK *et al.*, 2012).

O sistema CRISPR/Cas9 tem sido utilizado, com sucesso, para produção de suínos geneticamente editados por vários autores entre eles (WHITWORTH *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2016). Esta ferramenta permitiu a criação de suínos resistentes à infecção pelo vírus da

síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos, uma enfermidade de grande importância econômica para a suinocultura, pela inativação do gene do receptor para o vírus presente nos macrófagos dos suínos (WHITWORTH *et al.*, 2015; BURKARD *et al.*, 2017).

CONCLUSÕES

A espécie suína apresenta grande potencial para produção de animais geneticamente modificados. Além da modificação de genes para melhoria da produção e qualidade da carne, esta espécie tem especial interesse como modelo em estudos biomédicos e pesquisa de biologia básica pela sua grande similaridade com humanos. Várias metodologias têm sido desenvolvidas para a produção de suínos geneticamente modificados, tendo com isso aumentado os índices de sucesso e diminuindo a variabilidade dos resultados. As ferramentas de edição gênica desenvolvidas recentemente, tais como o sistema CRISPR/Cas, podem resultar em ganhos ainda mais significativos para a transgenia. Sendo assim, a escolha das metodologias para produção de animais transgênicos com maiores taxas de sucesso vai depender da finalidade pretendida para o organismo, bem como das condições experimentais disponíveis para tal.

REFERÊNCIAS

- AREZZO, F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. **Cell Biology International Reports**, v. 13, p. 391-404. 1989.
- BIEBER, T.; MEISSNER, W.; KOSTIN, S.; NIEMANN, A.; ELSASSER, H.P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine–DNA complexes. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 441-454. 2002.
- BRACKETT, B. G.; BARANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, p. 353-7. 1971.
- BREWER, M.S.; ZHU, L.G.; McKEITH, F.K. Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. **Meat Science**, v. 59, p. 153-163, 2001.
- BURKARD, C.; LILLICO, S.G.; REID, E.; JACKSON, B.; MILEHAM, A.J.; AIT-ALI, T.; WHITELAW, C.B.; ARCHIBALD, A.L. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully

resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. **PLOS Pathogens**, v. 13, p. e1006206, 2017.

CABOT, R.A.; KÜHHOLZER, B.; CHAN, A.W.; LAI, L.; PARK, K.W.; CHONG, K.Y.; SCHATTEN, G.; MURPHY, C.N.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. **Animal Biotechnology**, v. 12, p. 205-14. 2001.

CAPPELLO, F.; STASSI, G.; LAZZERESCHI, D.; RENZI, L.; DI STEFANO, C.; MARFÉ, G.; GIANCOTTI, P.; WANG, H.J.; STOPPACCIARO, A.; FORNI, M.; BACCI, M.L.; TURCHI, V.; SINIBALDI, P.; ROSSI, M.; BRUZZONE, P.; PRETAGOSTINI, R.; DELLA CASA, G.; CORTESINI, R.; FRATI, L.; LAVITRANO, M. hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer. **Transplantation Proceedings**, v. 32, p. 895-896, 2000.

CEASAR, S.A.; RAJAN, V.; PRYKHOZHII, S.V.; BERMAN, J.N.; IGNACIMUTHU, S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, p. 2333-2344, 2016.

CHEN, H.-L.; YANG, H.-S.; HUANG, R.; TSAI, H.-J. Transfer of a foreign gene to

Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) by direct testis-injection. **Aquaculture**, v. 253, p. 249-258, 2006.

CHOU, C.J.; PENG, S.-Y.; WU, M.-H.; YANG, C.-C.; LIN, Y.-C.; CHENG, W.T.-K. Generation and characterization of a transgenic pig carrying a DsRed-monomer reporter gene. **PLoS One**, v. 9, p.e106864. 2014.

DA SILVA, Z.; SOUZA, A.P.; PANDOLFI, J.R.C.; FONSECA, F.N.; LIMA-ROSA, C.A.V.; MARQUES, M.G. Comparison between electroporation and polyfection in pig sperm: efficiency and cell viability implications. **Zygote**, v. 26, p. 286-293, 2018.

FANG, G.-F.; CHEN, W.; WANG, S.-D.; WANG, Y.-D.; LI, C.-H.; ZHU, H.-L.; WANG, H.; ZENG, Y.-Q. Generation of Transgenic Pigs Overexpressing PID1 Gene Mediated by Magnetic Nanoparticles and Sperm. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 12, p. 161-168. 2017.

GODBEY, W.T.; MIKOS, A.G. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p. 115-125, 2001.

GOLOVAN, S.P.; MEIDINGER, R.G.; AJAKAIYE, A.; COTTRILL, M.; WIEDERKEHR, M.Z.; BARNEY, D.J.;

- PLANTE, C.; POLLARD, J.W.; FAN, M.Z.; HAYES, M.A.; LAURSEN, J.; HJORTH, J.P.; HACKER, R.R.; PHILLIPS, J.P.; FORSBERG, C.W. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 741. 2001.
- GORDON, J.W.; SCANGOS, G.A.; PLOTKIN, D.J.; BARBOSA, J.A.; RUDDLE, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7380-7384, 1980.
- GORDON, J.W.; RUDDLE, F.H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, v. 214, p. 1244-1246, 1981
- GUTIERREZ, K.; DICKS, N.; GLANZNER, W.G.; AGELLON, L.B.; BORDIGNON, V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 293, 2015.
- HAMMER, R.E.; PURSEL, V.G.; REXROAD Jr, C.E.; WALL, R.J.; BOLT, D.J.; EBERT, K.M.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680, 1985.
- HORAN, R.; POWELL, R.; BIRD, J.M.; GANNON, F.; HOUGHTON, J.A. Effects of electropermeabilization on the association of foreign DNA with pig sperm. **Archives of Andrology**, v. 28, p. 105-14. 1992.
- HU, S.; QIAO, J.; CHEN, C.; NI, W.; WUJIAFU, S.; MA, S.; ZHANG, H.; SHENG, J. Transgenic shRNA pigs reduce susceptibility to foot and mouth disease virus infection. **Elife**, v. 4, p. e06951, 2015.
- HYUN, S.; LEE, G.; KIM, D.; KIM, H.; LEE, S.; NAM, D.; JEONG, Y.; KIM, S.; YEOM, S.; KANG, S.; HAN, J.; LEE, B.; HWANG, W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1060-1068, 2003.
- JAENISCH, R.; MINTZ, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 1250-1254. 1974.
- JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, p. 816-21. 2012.

KANG, J.T.; RYU, J.; CHO, B.; LEE, E.J.; YUN, Y.J.; AHN, S.; LEE, J.; JI, D.Y.; LEE, K.; PARK, K.W. Generation of RUNX3 knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 970-978. 2016.

KAUFMAN, J.F.; AUFFRAY, C.; KORMAN, A.J.; SHACKELFORD, D.A.; STROMINGER, J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. **Cell**, v. 36, p. 1-13, 1984.

KIM, J.H.; JUNG-HA, H.S.; LEE, H.T.; CHUNG, K.S. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 515-526, 1997.

KUMAR PRAMOD, R.; KUMAR, R.; MITRA, A. Transgenic expression of green fluorescent protein in caprine embryos produced through electroporation-aided sperm-mediated gene transfer. **Gene**, v. 576, p. 505-511, 2016.

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. 717-23. 1989.

LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; ZANI, M.; FRATI, L.; SPADAFORA, C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 161-169, 1992.

LAVITRANO, M.; MAIONE, B.; FORTE, E.; FRANCOLINI, M.; SPERANDIO, S.; TESTI, R.; SPADAFORA, C. The Interaction of Sperm Cells with Exogenous DNA: A Role of CD4 and Major Histocompatibility Complex Class II Molecules. **Experimental Cell Research**, v. 233, p. 56-62, 1997.

LAVITRANO, M.; STOPPACCIARO, A.; BACCI, M.L.; FORNI, M.; FIORETTI, D.; PUCCI, L.; DI STEFANO, C.; LAZZERESCHI, D.; RUGHETTI, A.; CERETTA, S.; ZANNONI, A.; RAHIMI, H.; MOIOLI, B.; ROSSI, M.; NUTI, M.; ROSSI, G.; SEREN, E.; ALFANI, D.; CORTESINI, R.; FRATI, L. Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 972-974, 1999.

LAVITRANO, M.; FORNI, M.; BACCI, M.L.; DI STEFANO, C.; VARZI, V.; WANG, H.; SEREN, E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 284-291, 2003.

- LAZZERESCHI, D.; FORNI, M.; CAPPELLO, F.; BACCI, M.L.; DI STEFANO, C.; MARFÉ, G.; GIANCOTTI, P.; RENZI, L.; WANG, H.J.; ROSSI, M.; DELLA CASA, G.; PRETAGOSTINI, R.; FRATI, G.; BRUZZONE, P.; STASSI, G.; STOPPACCIARO, A.; TURCHI, V.; CORTESINI, R.; SINIBALDI, P.; FRATI, L.; LAVITRANO, M. Efficiency of transgenesis using sperm-mediated gene transfer: generation of hDAF transgenic pigs. **Transplantation Proceedings**, v. 32, p. 892-894, 2000.
- LI, Q.; WEI, H.; GUO, Y.; LI, Y.; ZHAO, R.; MA, Y.; YU, Z.; TANG, B.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LI, N. Production of human lysozyme-transgenic cloned porcine embryos by somatic nuclear transfer. **Progress in Natural Science**, v. 19, p. 699-704. 2009.
- LI, Z.; ZENG, F.; MENG, F.; XU, Z.; ZHANG, X.; HUANG, X.; TANG, F.; GAO, W.; SHI, J.; HE, X.; LIU, D.; WANG, C.; URSCHITZ, J.; MOISYADI, S.; WU, Z. Generation of transgenic pigs by cytoplasmic injection of piggyBac transposase-based pmGENIE-3 plasmids. **Biology of Reproduction**, v. 90, p. 93, 2014.
- LU, D.; LIU, S.; SHANG, S.; WU, F.; WEN, X.; LI, Z.; LI, Y.; HU, X.; ZHAO, Y.; LI, Q.; LI, N. Production of transgenic-cloned pigs expressing large quantities of recombinant human lysozyme in milk. **PLoS One**, v. 10, p. e0123551, 2015.
- MOJICA, F.J.; JUEZ, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 613-21. 1993.
- PALEYANDA, R.K.; VELANDER, W.H.; LEE, T.K.; SCANDELLA, D.H.; GWAZDAUSKAS, F.C.; KNIGHT, J.W.; HOYER, L.W.; DROHAN, W.N.; LUBON, H. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 971-5. 1997.
- PEREYRA-BONNET, F.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; OLIVERA, R.; JARAZO, J.; VICHERA, G.; GIBBONS, A.; SALAMONE, D. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 741-749, 2008.
- PERLEBERG, C.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. Genetically engineered pigs as models for human disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, p. dmm030783, 2018.
- PINKERT, C.A. Engenharia Genética em Animais Domésticos. In: HAFEZ, E.S.E.;

HAFEZ, B. (eds.). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

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

TSAI, H.-J. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 4, 2000.

UCHIDA, M.; SHIMATSU, Y.; ONOE, K.; MATSUYAMA, N.; NIKI, R.; IKEDA, J.E.; IMAI, H. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. **Transgenic Research**, v. 10, p. 577-582. 2001.

VAN COTT, K.E.; LUBON, H.; GWAZDAUSKAS, F.C.; KNIGHT, J.; DROHAN, W.N.; VELANDER, W.H. Recombinant human protein C expression in milk of transgenic pigs and effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels. **Transgenic research**, v. 10, p. 43-51, 2001.

VARGIOLU, A.; MANZINI, S.; CECCO, M.; BACCI, M.L.; FORNI, M.; GALEATI, G.; CERRITO, M.G.; BUSNELLI, M.; LAVITRANO, M.; GIOVANNONI, R. In

vitro production of multigene transgenic blastocysts via sperm-mediated gene transfer allows rapid screening of constructs to be used in xenotransplantation experiments. **Transplantation Proceedings**, v. 42, p. 2142-2145, 2010.

WALL, R.J. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. **Theriogenology**, v. 45, p. 57-68. 1996.

WHITELAW, C.B.A.; FARINI, E.; WEBSTER, J. The changing role of cell culture in the generation of transgenic livestock. **Cytotechnology**, v. 31, p. 3-8. 1999.

WHITELAW, C.B.; RADCLIFFE, P.A.; RITCHIE, W.A.; CARLISLE, A.; ELLARD, F.M.; PENA, R.N.; ROWE, J.; CLARK, A.J.; KING, T.J.; MITROPHANOUS, K.A. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. **FEBS Letters**, v. 571, p. 233-6, 2004.

WHITWORTH, K.M.; LEE, K.; BENNE, J.A.; BEATON, B.P.; SPATE, L.D.; MURPHY, S.L.; SAMUEL, M.S.; MAO, J.; O'GORMAN, C.; WALTERS, E.M.; MURPHY, C.N.; DRIVER, J.; MILEHAM, A.; McLAREN, D.; WELLS, K.D.; PRATHER, R.S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs

from in vitro-derived oocytes and embryos.

Biology of Reproduction, v. 91, p. 78. 2014.

WHITWORTH, K.M.; ROWLAND, R.R.; EWEN, C.L.; TRIBLE, B.R.; KERRIGAN, M.A.; CINO-OZUNA, A.G.; SAMUEL, M.S.; LIGHTNER, J.E.; McLAREN, D.G.; MILEHAM, A.J.; WELLS, K.D.; PRATHER, R.S. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 20, 2015.

WU, Z.; XU, Z.; ZOU, X.; ZENG, F.; SHI, J.; LIU, D.; URSCHITZ, J.; MOISYADI, S.; LI, Z. Pig transgenesis by piggyBac transposition in combination with somatic cell nuclear transfer. **Transgenic Research**, v. 22, p. 1107-1118, 2013.

ZANI, M.; LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; LULLI, V.; MAIONE, B.; SPERANDIO, S.; SPADAFORA, C. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. **Experimental Cell Research**, v. 217, p. 57-64, 1995.

ZHANG, Y.; XI, Q.; DING, J.; CAI, W.; MENG, F.; ZHOU, J.; LI, H.; JIANG, Q.; SHU, G.; WANG, S.; ZHU, X.; GAO, P.; WU, Z. Production of transgenic pigs mediated by pseudotyped lentivirus and sperm. **PLoS One**, v. 7, p. e35335, 2012.

ZHOU, C.Y.; MCINNES, E.; COPEMAN, L.; LANGFORD, G.; PARSONS, N.; LANCASTER, R.; RICHARDS, A.; CARRINGTON, C.; THOMPSON, S. Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. **Xenotransplantation**, v. 12, p. 142-148, 2005.

ZHOU, X.; XIN, J.; FAN, N.; ZOU, Q.; HUANG, J.; OUYANG, Z.; ZHAO, Y.; ZHAO, B.; LIU, Z.; LAI, S.; YI, X.; GUO, L.; ESTEBAN, M.A.; ZENG, Y.; YANG, H.; LAI, L. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. **Cell Molecular Life Science**, v. 72, p. 1175-84. 2015.