



A espécie caprina como modelo para produção de proteínas recombinantes

Goat as a model for production of recombinant proteins

Vicente José Figueirêdo Freitas^{1,5}, Luciana Magalhães Melo¹, Dárcio Ítalo Alves Teixeira¹, Gandhi Rádís-Baptista², Luiz Sérgio de Almeida Camargo³, Daniel Felipe Salamone⁴

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Instituto de Ciências do Mar (Labomar), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite, Valença, MG, Brasil.

⁴Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

⁵Correspondência: vicente.freitas@uece.br

Resumo

Vários sistemas para a produção de proteínas recombinantes têm sido utilizados para a otimização da produção das mesmas. A glândula mamária é considerada um sistema muito interessante para a produção destas proteínas devido ao seu alto nível de expressão e à sua capacidade para realizar modificações pós-traducionais. Caprinos podem produzir elevadas quantidades de leite durante um longo período de lactação e, portanto, tornam-se importantes candidatos como biorreatores para a expressão de proteínas recombinantes no leite. No entanto, caprinos transgênicos não são de fácil obtenção devido à baixa eficiência dos métodos e à expressão imprevisível da proteína recombinante. O incremento na eficiência dos métodos na transgênese em caprinos é um grande desafio a superar. Esta revisão tem por objetivo apresentar o estado atual dos métodos tradicionais, bem como apresentar técnicas emergentes para obtenção eficiente de caprinos transgênicos.

Palavras-chave: caprinos, transgênese, biotecnologia.

Abstract

Aiming the optimization for recombinant protein production, various systems have been used. The mammary gland is considered to be a very interesting system for the production of these proteins due to its high level of expression and its ability to perform post-translational modifications. Goats can produce large quantities of milk over a long lactation period, and therefore this species is an important candidate for recombinant protein expression in milk. However, it is not easy to generate transgenic goats due to the low efficiency of methods and unpredictable expression of recombinant protein. An increase in efficiency for transgenic methodologies for goats is a big challenge to overcome. This review aims to present the state of art of the traditional methods, as well as the emerging technologies for obtaining transgenic goats efficiently.

Keywords: goats, transgenesis, biotechnology.

Introdução

A tecnologia do DNA recombinante revolucionou a produção de proteínas de interesse terapêutica em medicina humana. Assim, os genes de um grande número de proteínas já foram identificados e clonados, incluindo fatores de coagulação, hormônio de crescimento (GH), insulina, eritropoietina (EPO), entre outros. As primeiras tentativas com intuito de produzir proteínas terapêuticas a partir de genes clonados foram realizadas em leveduras e bactérias. No entanto, para muitas proteínas, esta abordagem não é viável, pois os microrganismos não são capazes de realizar as modificações pós-traducionais necessárias para a perfeita atividade da proteína (Swartz, 2001).

Embora o cultivo de células de mamíferos, normalmente células de ovário de hamster chinês (CHO), forneça as modificações necessárias, este torna-se extremamente caro (Bösze et al., 2008). Assim, o uso de animais de como biorreatores pode ser a melhor escolha para a produção de proteínas terapêuticas (Kues e Niemann, 2011). Isto deve-se ao fato da elevada habilidade da glândula mamária em realizar eficientemente as modificações pós-traducionais e obter uma proteína mais próxima possível da nativa (Houdebine, 2007). Para esta atividade promissora foi até criado o termo "*pharming*", um portmanteau das palavras em inglês *pharmaceutical* (farmacêutico) e *farming* (pecuária), para referir-se à utilização da engenharia genética na obtenção de animais transgênicos ou geneticamente modificados (AGM) que secretam em seu leite proteínas de uso terapêutico.

O uso das biotécnicas para a obtenção de AGM tem sido limitado devido ao alto custo desse tipo de atividade (Kues e Niemann, 2011). Nesse tocante, é fundamental a escolha correta da espécie a ser utilizada como biorreator, a qual depende de vários fatores (Tab. 1). Entretanto, a quantidade de proteína requerida e a produção em escala de tempo são fatores-chave. Além disso, devem ser considerados a viabilidade e os custos



para a manutenção dos animais (Bösze et al., 2008). Um importante ponto a ser observado é a existência de prováveis efeitos sistêmicos da proteína recombinante no organismo do animal, fato este que já foi evidenciado pelos trabalhos de nosso grupo (Batista et al., 2014).

Tabela 1. Animais de produção obtidos pela tecnologia transgênica, principais vantagens/desvantagens de seu uso como biorreator e referencia do relato pioneiro.

Espécie	Vantagens	Desvantagens	Referência
Leporina	Curto intervalo de geração, nascimento de várias crias	Produção leiteira muito baixa	Hammer et al. (1985)
Suína	Prenhez curta, nascimento de várias crias	Produção leiteira baixa, difícil microinjeção de DNA	Hammer et al. (1985)
Ovina	Prenhez curta, nascimento de várias crias	Produção leiteira baixa, difícil microinjeção de DNA	Hammer et al. (1985)
Caprina	Prenhez curta, nascimento de várias crias, boa produção leiteira	Difícil microinjeção de DNA	Ebert et al. (1991)
Bovina	Elevada produção leiteira	Difícil microinjeção de DNA, longo intervalo de geração, elevado custo	Krimpenfort et al. (1991)

Considerando as vantagens e desvantagens de cada espécie, caprinos aparecem como um excelente modelo para uso como biorreator. Além disso, foi a partir do leite de cabras transgênicas que foi obtido o primeiro medicamento aprovado para uso humano: o Atryn[®], o qual é usado em pacientes com deficiência hereditária de antitrombina (AT) ao serem submetidos a procedimentos cirúrgicos ou no parto. Esta aprovação para uso comercial ocorreu primeiramente na Europa (Schmidt, 2006) e, logo após, nos EUA (Lavine, 2009).

A glândula mamária pode ser considerada como o melhor biorreator disponível, pois o leite representa uma fonte de matéria-prima não transformada, segura, abundante, renovável e de fácil obtenção (Houdebine, 2007). A expressão do transgene glândula mamária requer a utilização de promotores de genes de proteínas do leite, isto é, sequências que direcionam a expressão gênica apenas na glândula mamária durante a lactação (Maga e Murray, 1995) e evitando efeitos deletérios sobre a saúde do animal. Em caprinos já foi utilizado β -caseína caprina (Ko et al., 2000), β -caseína bovina (Huang et al., 1998) e α s1-caseína (Freitas et al., 2012).

A obtenção de animais de produção transgênicos foi demonstrada como viável há mais de três décadas atrás (Hammer et al., 1985). Também ficou evidente quase que imediatamente que o método utilizado para obtenção desses animais apresentava limitações substanciais que poderiam impedir seu uso tanto para pesquisa quanto para fins comerciais. Assim, esta revisão apresentará nos itens a seguir os diversos métodos de produção de caprinos transgênicos, bem como tecnologias emergentes que podem trazer melhorias na eficiência do processo.

Microinjeção de DNA em embriões pró-nucleares

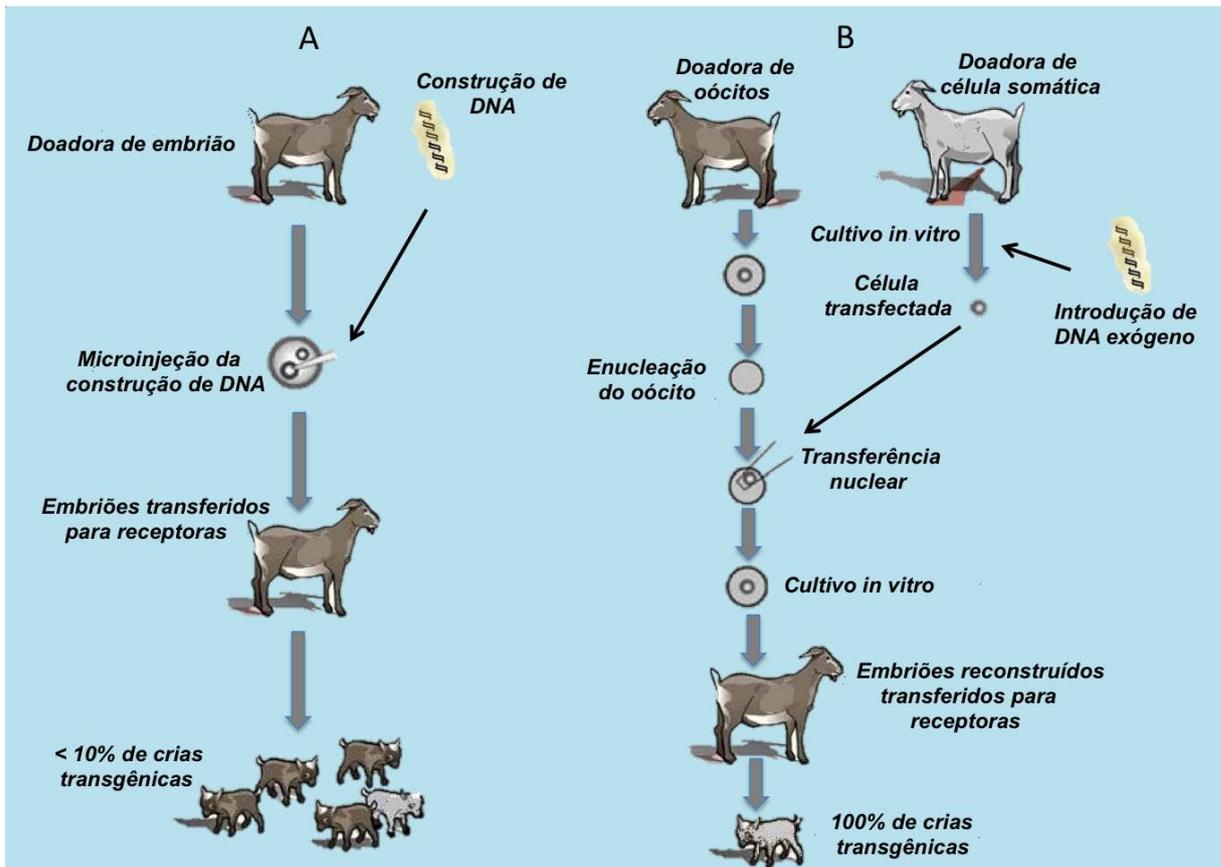
O primeiro relato sobre embriões caprinos microinjetados com uma construção de DNA foi realizado com o objetivo de obter animais transgênicos secretando o ativador do plasminogênio tecidual humano (tPA) em seu leite (Ebert et al., 1991). Após este primeiro sucesso, várias outras proteínas humanas foram produzidas em cabras utilizando a técnica microinjeção pró-nuclear. No entanto, a eficiência desta técnica é baixa, especialmente quando comparada com a obtida em camundongos. Em caprinos, cerca de 10% ou menos dos embriões microinjetados produzirão crias transgênicas (revisado por Baldassarre et al. 2004).

A microinjeção pró-nuclear tem um conceito simples: injetar um pequeno volume contendo cópias do gene de interesse no pró-núcleo do embrião recém-fecundado para, posteriormente, transferir os mesmos para o oviduto de uma receptora (Fig. 1A). Contudo, a microinjeção é um procedimento que requer destreza e paciência do operador. Em camundongos, os pró-núcleos são claramente visíveis, mas nas espécies de produção (bovinos, suínos, ovinos e caprinos), torna-se necessário submeter os embriões a uma rápida centrifugação (Moura et al., 2010). Sem esta operação, os pró-núcleos do embriões caprinos só podem ser visualizados em somente 30% das vezes (Ebert et al., 1991).

Através desta metodologia vários caprinos transgênicos foram obtidos secretando diversas proteínas humanas para uso terapêutico, tais como: tPA (Ebert et al., 1991), Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos – G-CSF (Ko et al., 2000), lisozima (Maga et al., 2006; Bertolini, 2016, UFRGS, informação pessoal) e lactoferrina (Zhang et al., 2008). Neste método, a integração do transgene é aleatória, em múltiplos sítios e pode ocorrer mosaicismos.

Nosso grupo, utilizando a microinjeção em embriões pró-nucleares obteve um casal de caprinos transgênicos para o G-CSF humano (Freitas et al., 2012). Após lactação hormonalmente induzida, a fêmea fundadora chegou a produzir uma média de 690 μ g de G-CSF por mililitro de leite e com atividade biológica

(Moura et al., 2013) e sua progênie exibiu valores na mesma grandeza (Batista et al., 2014).



Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS)

A TNCS, quando combinada com técnicas de biologia molecular e cultivo celular, apresenta uma variedade de aplicações. Entre as diferentes possibilidades, a transgênese é possivelmente a que mais se beneficiou com o avanço nessa biotécnica, aumentando sua eficiência e diminuindo os custos. Desde o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997), o protocolo da TNCS continua praticamente o mesmo, o qual consiste na transferência do núcleo de células do animal doador para oócitos enucleados e posterior reconstrução do embrião através de fusão celular (Fig. 1B). Utilizando este método, a modificação genética acontece pela incorporação da construção de DNA no genoma da célula em cultivo, permitindo que as células geneticamente modificadas sejam completamente caracterizadas (local de integração, número de cópias e integridade do transgene) antes da utilização na produção de embriões por transferência nuclear. Como resultado, embora a capacidade de desenvolvimento de embriões reconstruídos seja menor, todas as crias nascidas são transgênicas, tornando esta tecnologia muito mais eficiente do que a microinjeção pró-nuclear (revisado por Menchaca et al., 2016). Através do uso desta metodologia Keefer et al (2002) relatam uma eficiência de 7,7%, ou seja, sete caprinos transgênicos nascidos a partir de 91 embriões reconstruídos transferidos para receptoras previamente preparadas.

Com o objetivo de produzir animais secretando proteínas de uso terapêutico, a aplicação da TNCS já foi responsável pelo nascimento de caprinos transgênicos para várias proteínas humanas: AT (Baguisi et al., 1999), lactoferrina (Wan et al., 2012), α -lactalbumina (Feng et al., 2015) e glucocerebrosidase (Bertolini, 2016, UFRGS, informação pessoal). No entanto, o uso da TNCS ainda apresenta algumas limitações, como por exemplo: a reprogramação do embrião pode ser incompleta, resultando em perda embrionária, aborto ou desenvolvimento anormal do feto (Keefer et al., 2001).

Métodos alternativos e pesquisas inovadoras

Não resta a menor dúvida que a microinjeção de DNA em embriões pró-nucleares e a TNCS são os métodos que obtiveram maior sucesso na produção de caprinos transgênicos. No entanto, em animais de laboratórios e outros animais de produção diferentes técnicas já foram descritas como métodos alternativos para as duas pioneiras e entre elas podemos citar: transferência gênica mediada por espermatozoides, transposons,



interferência por RNA, endonucleases, nucleases dedo de zinco, lentivírus e, mais recentemente, o sistema CRISPR/Cas9. Nos parágrafos a seguir, iremos fornecer um pouco mais de informações sobre algumas dessas técnicas que parecem mais acessíveis e promissoras.

O uso de vetores lentivirais (VL) surgiu há alguns anos com base na capacidade do vírus se integrar ao genoma do hospedeiro. Os VL mais utilizados são o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV1), o vírus da imunodeficiência símia e os vetores derivados do vírus da anemia infecciosa equina (Park, 2007). Por serem capazes de se integrar eficientemente no genoma de células com menor silenciamento de genes do que outras estratégias, esta técnica foi rapidamente testada e comprovada em espécies de produção como bovinos (Hofman et al., 2004) e ovinos (Crispo et al., 2015a).

Em ovinos, a transferência gênica mediada por espermatozoides já foi um dos métodos utilizados na tentativa de obter animais transgênicos (Pereyra-Bonnet et al., 2011). Em caprinos, Shadanloo et al. (2010) verificaram a possibilidade de utilização desta técnica para a obtenção de embriões transgênicos. Nesse estudo, os autores demonstraram que a técnica de fecundação (fecundação *in vitro* vs. injeção intracitoplasmática de espermatozoide) e, até certo ponto, a concentração do DNA, afetam o desenvolvimento embrionário e a expressão do transgene. Posteriormente, Zao et al. (2012) verificaram que embora os espermatozoides caprinos possam incorporar o DNA exógeno, a presença do plasma seminal o inibe parcialmente.

O sistema CRISPR (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, consiste em pequenas porções do DNA bacteriano compostas por repetições de nucleotídeos. A CRISPR é na verdade um mecanismo de defesa do sistema imune bacteriano contra fagos e plasmídeos invasores. Atualmente, encontra-se disponível um gRNA (RNA guia) com a capacidade de mimetizar o que ocorre naturalmente em bactérias, e desta forma, promover o direcionamento da nuclease Cas9 para uma sequência alvo específica para que esta promova a clivagem e a sequência de interesse. Tais fundamentos permitem considerar o sistema CRISPR (CRISPR/Cas9) uma técnica rápida, com relativa facilidade de manipulação e baixo custo quando comparada a técnicas anteriormente descritas (Wang et al., 2015). Dessa forma, já existem relatos do nascimento de AGM, tanto em ovinos (Crispo et al., 2015b) quanto em caprinos (Wang et al., 2015), com o uso desta nova metodologia.

No intuito de aumentar o sucesso da tecnologia transgênica em animais de produção, torna-se necessário desenvolver métodos simples, econômicos e eficientes. Assim, o uso de Peptídeos de Penetração Celular (PPCs) constitui uma alternativa que está sendo pesquisada atualmente por nosso grupo. Os PPCs são moléculas que possuem a capacidade de internalizar moléculas biologicamente ativas em células eucarióticas através de um mecanismo independente da energia (Rádis-Baptista e Kerkis, 2011). Os PPCs são representados por sequências múltiplas de peptídeos curtos e carregados positivamente, ricos em arginina e resíduos de lisina, que penetram através de membranas celulares impermeáveis e se acumulam no citoplasma e/ou no núcleo da célula (Gupta et al., 2005). Kerkis et al. (2004) descreveram que a crotamina, uma miotoxina isolada do veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) da América do Sul, é um PPC de apresentação tanto citoplasmática quanto nuclear. Demonstrou-se também que esta toxina é capaz de se ligar eletrostaticamente ao DNA, formando um complexo peptídeo-DNA e realizando a entrega no interior das células (Nascimento et al., 2007). Assim, utilizando embriões bovinos, nosso grupo verificou que a crotamina pode translocar embriões intactos quando aplicada ao meio de cultivo nas concentrações 0,1-10 μM (Campelo et al., 2016a). Além disso, a crotamina foi capaz de translocar embriões após 1 h de exposição durante cultivo e sem prejudicar o desenvolvimento dos mesmos. No entanto, seu uso não melhorou a expressão do DNA exógeno, provavelmente devido à forte complexação DNA/crotamina (Campelo et al., 2016b).

Considerações finais

Em caprinos, a microinjeção pró-nuclear e a TNCS continuam a ser as ferramentas que mais produziram animais transgênicos. No entanto, novas estratégias estão em contínuo desenvolvimento e podem, em futuro bem próximo, modificar esta condição. O sucesso destas novas técnicas pode contribuir para incrementar o sucesso da transgênese, facilitando a obtenção de diferentes proteínas recombinantes e tornando este um sistema de produção muito competitivo.

Agradecimentos

Os autores são agradecidos pela participação dos Drs. Oleg Serov, Irina Serova e Lyudmila Andreeva quando da obtenção dos caprinos transgênicos para o G-CSF pelo nosso grupo. Os resultados do grupo apresentados neste artigo foram obtidos através de apoio financeiro do CNPq, CAPES, Embrapa e FUNCAP/PRONEX. Vicente J.F. Freitas, Gandhi Rádis-Baptista e Luiz S.A. Camargo são pesquisadores do CNPq.



Referências

- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999.
- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.255-266, 2004.
- Batista RITP, Melo CH, Souza-Fabjan JMG, Teixeira DIA, Melo LM, Freitas VJF.** Phenotypic features of first-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulation factor production in milk. *Biotechnol Lett*, v.36, p.2155-2162, 2014.
- Bösze Z, Baranyi M, Whitelaw CB.** Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species. *Adv Exp Med Biol*, v. 606, p. 357-393, 2008.
- Campelo IS, Pereira AF, Alcântara-Neto AS, Canel NG, Souza-Fabjan JM, Teixeira DI, Camargo LS, Melo LM, Rádis-Baptista G, Salamone DF, Freitas VJ.** Effect of crotamine, a cell-penetrating peptide, on blastocyst production and gene expression of in vitro fertilized bovine embryos. *Zygote*, v.24, p.48-57, 2016a.
- Campelo IS, Canel NG, Bevacqua RJ, Melo LM, Rádis-Baptista G, Freitas VJ, Salamone DF.** Crotamine, a cell-penetrating peptide, is able to translocate parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos but does not improve exogenous DNA expression. *J Assist Reprod Genet*, v.33, p.1405-1413, 2016b.
- Crispo M, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Barrera N, Mulet AP, Nguyen TH, Anegón I, Menchaca A.** Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res*, v.24, p.31-41, 2015a.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A.** Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, v.10, e0136690, 2015b.
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K.** Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)*, v.9, p.835-838, 1991.
- Feng X, Cao S, Wang H, Meng C, Li J, Jiang J, Qian Y, Su L, He Q, Zhang Q.** Production of transgenic dairy goat expressing human α -lactalbumin by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res*, v.24, p.73-85, 2015.
- Freitas VJF, Serova IA, Moura RR, Andreeva LE, Melo LM, Teixeira DIA, Pereira AF, Lopes Júnior ES, Dias LPB, Nunes-Pinheiro DCS, Sousa FC, Alcântara-Neto AS, Albuquerque ES, Melo CHS, Rodrigues VHV, Batista RITP, Dvoryanchikov GA, Serov OL.** The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Rumin Res*, v.105, p.105-113, 2012.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N.** Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res*, v.349, p.665-678, 2005.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL.** Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, v.315, p.680-683, 1985.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A.** Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod*, v.71, p.405-409, 2004.
- Houdebine LM.** Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol*, v.360, p.163-202, 2007.
- Huang S, Zhang K, Huang Y, Chen M, Li H, Lu D, Lu J, Chen Y, Qiu X, Xue J, Zeng Y.** Secretion of biological active human IX protein in the milk of transgenic goats. *Chin Sci Bull*, v. 43, p. 1317-1319, 1998.
- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A, Karatzas CN.** Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod*, v.64, p.849-856, 2001.
- Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN.** Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod*, v. 66, p. 199-203, 2002.
- Kerkis A, Kerkis I, Rádis-Baptista G, Oliveira EB, Vianna-Morgante AM, Pereira LV, Yamane, T.** Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *FASEB J*, v.18, p.1407-1409, 2004.
- Ko JH, Lee CS, Kim KH, Pang MG, Koo JS, Fang N, Koo DB, Oh KB, Youn WS, Zheng GD, Park JS, Kim SJ, Han YM, Choi IY, Lim J, Shin ST, Jin SW, Lee KK, Yoo OJ.** Production of biologically active human granulocyte colony-stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Res*, v.9, p.215-222, 2000.
- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R, de Boer H.** Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (NY)*, v.9, p.844-847, 1991.



- Kues WA, Niemann H.** Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med*, v. 102, p. 146-156, 2011.
- Lavine G.** FDA approves first biological product derived from transgenic animal. *Am J Health Syst Pharm*, v.66, p.518, 2009. Abstract.
- Maga EA, Murray JD.** Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology (NY)*, v. 13, p. 1452-1457, 1995.
- Maga EA, Shoemaker CF, Rowe JD, Bondurant RH, Anderson GB, Murray JD.** Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. *J Dairy Sci*, v.89, p.518-524, 2006.
- Menchaca A, Anegón I, Whitelaw CB, Baldassarre H, Crispo M.** New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology*, v.86, p.160-169, 2016.
- Moura RR, Lopes-Junior ES, Teixeira DI, Serova IA, Andreeva LE, Melo LM, Freitas VJF.** Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats for DNA microinjection. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.101-106, 2010.
- Moura RR, Albuquerque ES, Melo CH, Alcântara-Neto AS, Batista RITP, Nunes-Pinheiro DCS, Pereira AF, Teixeira DIA, Melo LM, Serova IA, Andreeva LE, Serov OL, Freitas VJF.** Dynamics of recombinant hG-CSF in transgenic goat: preliminary study in the founder during hormonally induced lactation. *Anim Biotechnol*, v.24, p.10-14, 2013.
- Nascimento FD, Hayashi MA, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Rádis-Baptista G, Nader HB, Yamane T, Tersariol ILS, Kerkis I.** Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparin sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, v.282, p.21349-21360, 2007.
- Park F.** Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*, v.31, p.159-173, 2007.
- Pereyra-Bonnet F, Gibbons A, Cueto M, Sipowicz P, Fernández-Martín R, Salamone D.** Efficiency of sperm-mediated gene transfer in the ovine by laparoscopic insemination, in vitro fertilization and ICSI. *J Reprod Dev*, v.57, p.188-196, 2011.
- Rádis-Baptista G, Kerkis I.** Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. *Curr Pharm Des*, v.17, p.4351-4361, 2011.
- Schmidt C.** Belated approval of first recombinant protein from animal. *Nat Biotechnol*, v.24, p.877, 2006.
- Shadanloo F, Najafi MH, Hosseini SM, Hajian M, Forouzanfar M, Ghaedi K, Abedi P, Ostadhosseini S, Hosseini L, Eskandari-Nasab MP, Esfahani MH.** Sperm status and DNA dose play key roles in sperm/ICSI mediated gene transfer in caprine. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.868-875, 2010.
- Swartz JR.** Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*, v.12, p.195-201, 2001.
- Wan YJ, Zhang YL, Zhou ZR, Jia RX, Li M, Song H, Wang ZY, Wang LZ, Zhang GM, You JH, Wang F.** Efficiency of donor cell preparation and recipient oocyte source for production of transgenic cloned dairy goats harboring human lactoferrin. *Theriogenology*, v.78, p.583-592, 2012.
- Wang Z.** Genome engineering in cattle: recent technological advancements. *Chromosome Res*, v. 23, p. 17-29, 2015.
- Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H, Dong Z, Niu Y, Shi B, Cai B, Liu J, Huang S, Yan H, Zhao X, Zhou G, He X, Chen X, Yang Y, Jiang Y, Shi L, Tian X, Wang Y, Ma B, Huang X, Qu L, Chen Y.** Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, v.5, p.13878, 2016.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Zhang J, Li L, Cai Y, Xu X, Chen J, Wu Y, Yu H, Yu G, Liu S, Zhang A, Chen J, Cheng G.** Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expr Purif*, v.57, p.127-135, 2008.
- Zhao Y, Yu M, Wang L, Li Y, Fan J, Yang Q, Jin Y.** Spontaneous uptake of exogenous DNA by goat spermatozoa and selection of donor bucks for sperm-mediated gene transfer. *Mol Biol Rep*, v.39, p.2659-2664, 2012.
-