

IV SEMANA DA CAPRINOCULTURA E OVINOCULTURA BRASILEIRAS
Embrapa Caprinos - Sobral, 20 a 24 de Setembro de 2004

Potencialidades e Aplicações Práticas da Biologia Molecular na Caprino-Ovinocultura

Gracia Maria Soares Rosinha

rosinha@cnpq.embrapa.br

Pesquisadora – Embrapa Caprinos
Fazenda Três Lagoas – Estrada Sobral Groaíras km 4
Caixa Postal D10 – 62011-970 – Sobral – CE

1. Introdução

A biotecnologia é utilizada desde os tempos mais remotos, onde microorganismos eram usados para a produção de pães, vinhos e iogurtes. Esta é definida como sendo um conjunto de técnicas que utilizam organismos vivos ou partes destes para produzir ou modificar produtos, melhorar geneticamente animais ou plantas, ou ainda desenvolver microorganismos para fins específicos. As técnicas de biotecnologia servem-se da biologia molecular, da engenharia genética, biologia celular, bioquímica, microbiologia, entre outras disciplinas. Os produtos oriundos da biotecnologia encontram aplicação nos campos científico, saúde humana e animal, agrônomo e ambiental (Cordeiro, 2000).

A estrutura da molécula do DNA (ácido desoxirribonucléico) foi descoberta nos anos 50 pelos cientistas James D. Watson e Francis Harry Crick. A engenharia genética surgiu no final da década de 60 com experimentos realizados em bactérias e vírus dando origem a experimentos com DNA.

Os animais, os seres humanos, as plantas e demais seres vivos são constituídos por moléculas que contêm carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre, além de outros elementos em diferentes proporções. Essas moléculas formam as proteínas, as quais executam a maior parte das funções celulares e são as responsáveis pelas vias metabólicas. Essas vias geram todos os produtos orgânicos secundários, como carboidratos e lipídios, componentes dos tecidos nos animais, da celulose nas plantas, entre outros. Com isso, a biotecnologia atual opera em nível molecular, onde as barreiras estabelecidas na formação das espécies desaparecem, sendo isto possível porque todos os seres vivos possuem o DNA como molécula fundamental portadora da informação gênica e compartilham o mesmo código genético. Essa informação codificada é que determina a fabricação de proteínas nos animais e em todos os seres vivos (Oda & Grunewaldt, 2003).

O código genético é responsável por transformar a seqüência dos nucleotídeos no DNA (Adenina, Citosina, Guanina ou Timina) em seqüências de aminoácidos, que são os formadores das proteínas. Cada proteína é derivada, portanto, da transcrição e tradução de um gene, sendo todo este processo conhecido como o famoso dogma central da Biologia Molecular, segundo o qual o fluxo de informações flui do DNA para o RNA e deste para as proteínas.

A produção da proteína inicia-se com o processo de transcrição, no qual uma molécula de RNA (ácido ribonucléico), denominada mensageira (RNAm), é sintetizada copiando a mensagem do DNA. Após a conclusão da transcrição, o RNAm é direcionado a partir do núcleo para o citoplasma da célula onde sua seqüência é traduzida na seqüência de aminoácidos para produzir as proteínas, utilizando o código

genético. Uma vez que esse código é universal, ou seja, uma mesma seqüência de nucleotídeos, quer seja no genoma da soja, quer seja de um animal ou de bactérias, resulta na produção da mesma proteína. Fato este que explica porque a maioria das técnicas utilizadas pela engenharia genética são aplicadas aos mais diversos seres vivos.

As técnicas de manipulação do DNA, que permitem o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado clonagem gênica, são ferramentas poderosas e importantes no estudo dos fenômenos biológicos com repercussão na saúde humana e animal, no meio ambiente, na agricultura e na tecnologia de alimentos.

A tecnologia do DNA recombinante, como se convencionou denominar este conjunto de técnicas tem uma ampla aplicação. Ela pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da seqüência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades. Sua aplicação comercial ou biotecnológica tem um potencial inesgotável.

Além disto, o rápido progresso da genética molecular tem motivado pesquisadores de todo o mundo para o uso direto de genes como forma de terapia. Inicialmente os estudos eram voltados para o tratamento de problemas genéticos, mas logo ficou evidente que as manipulações genéticas envolvendo genes específicos e vetores de expressão direcionados para eucariotos, poderiam ser usados como tratamento ou na ação preventiva para várias doenças.

A caprino-ovinocultura com o efetivo de ovinos e caprinos, de aproximadamente 14.638.925 e 9.537.439 de cabeças, respectivamente, (IBGE, 2001) contribuem para a geração de divisas para o País. Ademais, a produção de caprinos e ovinos constitui-se uma das principais fontes de renda da população rural nordestina e de pequenos produtores de outras regiões do País, além de exercer uma função social de grande relevância, que é a fixação do homem no campo, evitando assim o êxodo rural.

Mudanças recentes nos hábitos alimentares das populações dos médios e grandes centros urbanos do País, têm exercido uma forte pressão de demanda pelos produtos oriundos da caprino-ovinocultura, principalmente pela carne. Impulsionada por esses aspectos, a cada dia, a atividade está caminhando a passos largos para se firmar como uma commodity de fundamental importância sócio-econômica no país, passando a representar uma alternativa potencial expressiva na oferta de carne, leite e de derivados, favorecendo o aspecto alimentar das populações rural e urbana.

Embora a Zona Semi-Árida do Nordeste Brasileiro seja considerada habitat adequado para a criação de caprinos e ovinos deslanados, há forte tendência de crescimento da exploração desses animais fora do chamado "polígono das secas". Assim é que a exploração desses animais, e principalmente de ovinos, tem-se expandido nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte, incluindo a Pré-Amazônia brasileira. Essas regiões, com os seus mais de 63 milhões de hectares de pastagens cultivadas, formam um vasto território com enorme potencial para a exploração intensiva e racional da caprino-ovinocultura, particularmente, para a produção de carne e peles de qualidade.

A Embrapa, caracterizada como uma Instituição de Excelência em pesquisas voltadas para o Agronegócio Brasileiro, reconhecida mundialmente, tem sido fortemente demandada pelos mais significativos segmentos do agronegócio da carne,

leite e couro do Brasil, a continuar desempenhando seu papel inovador e desenvolver pesquisas de ponta ligadas a doenças que constituem fortes barreiras sanitárias na caprino-ovinocultura, para o abastecimento interno e externo de produtos de origem animal de qualidade. Ademais, algumas dessas doenças além de pôr em risco a saúde do rebanho, constituem sérios problemas de saúde pública.

O avanço das técnicas de Biologia Molecular nas últimas duas décadas tem contribuído com a evolução das Ciências Biológicas, incluindo a Ciência Animal.

A Biotecnologia Molecular aplicada à saúde animal envolve a área de proteômica e genômica, com sua extensão para a terapia gênica, diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção de doenças, incluindo-se nesta vertente a construção e produção de moléculas recombinantes de ácidos nucleicos e proteínas, usadas na vacinação animal.

A alta incidência de doenças que acometem caprinos e ovinos é um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento da caprino-ovinocultura na região Nordeste do Brasil. Os prejuízos econômicos causados pelas enfermidades ocorrem através da diminuição da produção de carne e leite, da condenação de peles e carcaças, deficiências na reprodução, descarte e morte dos animais. Em virtude disto, uma das áreas com maior potencialidade de aplicação da biologia molecular na caprino-ovinocultura é a área de sanidade animal, seja na linha de desenvolvimento de vacinas ou desenvolvimento de teste de diagnósticos para as mais diversas doenças responsáveis pelos mais variados prejuízos causados a este ramo do agronegócio brasileiro.

2. Estudos e Desenvolvimento de Vacinas

O desenvolvimento de vacinas e sua aplicação no meio real requerem estudos. As vacinas convencionais para pequenos ruminantes ainda são bastante reduzidas, sendo utilizadas vacinas de bovinos e em dosagens menores. Portanto, se faz necessário o aprimoramento de vacinas e seu uso em caprinos e ovinos.

As vacinas têm como objetivo fundamental a imunização prévia do animal, de modo que ele passe a responder rápida e eficientemente quando em contato com o agente infeccioso, evitando assim a ocorrência ou desenvolvimento da doença. Diversas estratégias foram utilizadas para o desenvolvimento de vacinas do decorrer dos tempos. Até o momento existem três gerações distintas de vacinas: i) vacinas de primeira geração, surgidas no começo deste século, são aquelas produzidas com microorganismos vivos atenuados ou mortos e inativados; ii) vacinas de segunda geração, que são as constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas ou recombinantes; iii) vacinas de terceira geração, as quais surgiram mais recentemente, são as vacinas gênicas ou de DNA e as vacinas vivas geneticamente modificadas.

3. Vacinas Gênicas ou Vacinas de DNA

O rápido progresso da genética molecular tem motivado pesquisadores de todo o mundo para o uso direto de genes como forma de terapia, seja como tratamento ou na

ação preventiva para várias doenças, através do uso da inovação biotecnológica das vacinas de terceira geração, como as vacinas de DNA, vacinas a base de peptídeos e as vacinas que utilizam microorganismos vivos recombinantes. A vacina de DNA é a mais recente forma de apresentação de antígenos que veio revolucionar o campo das vacinas. Ela representa um novo caminho para a administração de proteínas imunogênicas. O uso das vacinas de DNA oferece uma série de vantagens econômicas, técnicas e logísticas quando comparado com as vacinas clássicas, especialmente se considerarmos a sua utilização nas condições oferecidas pelos países em desenvolvimento. Por exemplo, a produção em larga escala é bem mais barata, a manutenção do controle de qualidade é mais fácil e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente (Azevedo & Oliveira, 1998). Outras vantagens potenciais deste tipo de imunização incluem a apresentação conformacional correta dos epitopos relevantes pelas células do hospedeiro, a possibilidade de gerar uma resposta imune celular sem o risco da replicação de vetores ou organismos vivos e a simplicidade e baixos custos da tecnologia envolvida na produção destas vacinas quando comparada com a obtenção de proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos (Waine & McManus, 1995).

Nas vacinas gênicas ou de DNA, um gene do agente causador da doença, que pode ser um vírus, bactéria, fungo ou parasita, que codifica um antígeno potencialmente imunogênico, é clonado em um vetor de expressão eucariótico e introduzido em um animal. A proteína de interesse vai ser expressa “*in vivo*”, mimetizando a apresentação antigênica como ocorre na infecção natural, sendo portanto capaz de induzir o sistema imunológico a produzir anticorpos ou estimular a imunidade mediada por células, principalmente linfócitos T auxiliares ou citotóxico, protegendo contra a infecção causada pelo agente patogênico de onde se originou o DNA. A Figura 1 ilustra a produção de uma vacina de DNA da clonagem do gene até o processo de imunização.

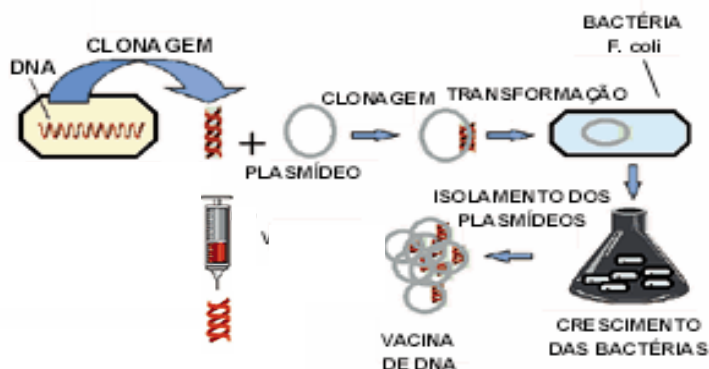


Figura 1. Esquema da estratégia de produção de uma vacina de DNA (adaptada de Silva, 1999)

Uma importante estratégia a ser considerada na otimização da eficácia das vacinas de DNA é a escolha do vetor a ser utilizado. Os requerimentos básicos na estrutura de um plasmídeo para vacina de DNA inclui um promotor para células eucarióticas, um sítio de clonagem, uma sequência de poliadenilação, um gene

marcador de seleção e uma origem de replicação em bactérias (Gurunathan *et al.*, 2000). Um promotor forte é essencial para uma ótima expressão do antígeno em células de mamíferos, sendo os promotores derivados de vírus, como o citomegalovírus (CMV), um dos mais utilizados. O sítio de clonagem *downstream* do promotor é o local para a inserção do gene heterólogo e, a inclusão de uma seqüência de poliadenilação (cauda polyA), como a do hormônio de crescimento bovino (BGH) ou a do vírus SV40, proporcionam a estabilização do transcrito mRNA. Os marcadores de seleção mais utilizados são os genes bacterianos de resistência a antibióticos, como o gene de resistência à ampicilina. Entretanto, uma vez que o gene de resistência à ampicilina é proibido para uso em humanos, o gene de resistência à canamicina é muitas vezes utilizado. A origem de replicação ColE1 de *Escherichia coli* está presente nos plasmídeos da série pUC, os quais são os mais utilizados em vacinas de DNA, devido o grande número de cópias que eles produzem na bactéria, o que permite uma excelente produção de DNA plasmidial na purificação (Garmory *et al.*, 2003).

A estrutura do plasmídeo utilizado nas vacinas de DNA é extremamente importante para a otimização da expressão do antígeno. Porém, existem outros aspectos que devem ser considerados e que influenciam na eficácia das vacinas de DNA: i) seqüência do gene; ii) co-expressão de seqüências estimulatórias; iii) sistema de introdução do plasmídeo e, iv) estimulação do sistema imune apropriado.

O esqueleto de um plasmídeo utilizado para vacina de DNA pode ser perfeitamente modificado para aumentar a sua imunogenicidade, via a manipulação do DNA plasmidial para a inclusão de determinadas seqüências estimulatórias. Uma característica importante nas vacinas de DNA é a possibilidade do próprio DNA servir como adjuvante no processo de imunização (Roman *et al.*, 1997). Esse efeito é mediado pelos motivos “CpG” presentes numa seqüência nucleotídica específica de 6 pares de bases contendo um dinucleotídeo CpG central, duas purinas na extremidade 5' e duas pirimidinas na extremidades 3', conhecido como seqüência de DNA imunoestimuladora (ISS) (Ballas *et al.*, 1996). Foi demonstrado que essas seqüências tem pelo menos duas ações: induzir a liberação de citocinas como IL-6, IL-12 e IFN- γ pelos macrófagos e linfócitos ativados, que são cruciais no controle de infecções bacterianas intracelulares (Klinmam *et al.*, 1996), e aumentar a expressão das moléculas co-estimuladoras nas células apresentadoras de antígenos envolvidas nas interações com os linfócitos (Sparwasser *et al.*, 1998).

Existem vários métodos de introdução do DNA plasmidial nas células do hospedeiro. Porém, os mais utilizados são a injeção intramuscular, onde o DNA é injetado diretamente nos músculos femoral ou quadríceps do animal, ou pela biobalística, usando o “gene gun”, onde partículas de ouro são cobertas com o DNA plasmidial e aceleradas diretamente na epiderme dos camundongos (Robinson, 1997; Davis, 1997). Existem diferenças entre as duas rotas de administração que podem influenciar no tipo de resposta imune a ser induzida, sendo a quantidade de DNA inoculado e a eficiência e o tipo de células transfectadas, os parâmetros de maior importância. Na injeção intramuscular, inocula-se 100 μ g do plasmídeo no animal a ser imunizado, enquanto a biobalística utiliza uma quantidade de DNA inferior a 1 μ g por administração, ou seja, mais do que cem vezes menos material biológico (Robinson & Torres, 1997). Com relação ao tipo de células apresentadoras de antígenos transfectadas no processo, foi observado que o músculo contém principalmente miócitos e alguns macrófagos residenciais enquanto a pele contém muitas células de Langerhans que se diferenciam em células dendríticas (Wolff *et al.*, 1992).

A imunização com DNA produz uma resposta imune de longa duração ativando linfócitos T CD4+ e CD8+, além de linfócitos B para a produção de anticorpos (Ulmer *et al.*, 1996). No entanto, de acordo com a rota de administração utilizada (injeção ou biobalística) a resposta imune pode ser direcionada para o perfil Th1 ou Th2. Estudos recentes vem mostrando que a injeção intramuscular induz, principalmente, uma resposta imune do tipo Th1, enquanto a imunização via biobalística, estimula uma resposta do tipo Th0 ou Th2 (Robinson *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1999).

Uma das principais desvantagens das vacinas de DNA é que estas carregam geralmente um antígeno, sendo, portanto a sua estrutura molecular menos complexa, por isso são muitas vezes menos imunogênicas que as vacinas que utilizam organismos mortos ou atenuados. Isto tem levado ao interesse no desenvolvimento de novos e seguros adjuvantes, para obter-se uma vacina de DNA mais efetiva (Hanlon & Argyle, 2001). Muitas classes de adjuvantes têm sido investigadas, incluindo complexo imunoestimulatórios, lipossomos e citocinas. O uso de citocinas é o mais promissor, já que estas podem orientar a resposta imune para o perfil Th1 ou Th2 de acordo com o tipo de resposta imune desejada (Kim *et al.*, 1997).

Com tais características, as vacinas de DNA trazem grandes esperanças para o campo da vacinologia, preservando todos os aspectos positivos das vacinas clássicas existentes e sem os riscos dos organismos vivos atenuados espontaneamente, que podem reverter a sua patogenicidade.

As vacinas de DNA são amplamente aplicáveis na área veterinária e oferecem um alto potencial para o desenvolvimento de vacinas inexistentes ou o desenvolvimento de novas vacinas para doenças as quais já existam vacinas, porém estas apresentam desvantagens, principalmente pouca eficiência de proteção.

A imunização genética tem se mostrado apropriada para prevenir infecções por patógenos intracelulares, nas quais a resposta imune mediada por células é responsável pela imunidade. Como exemplos podemos citar *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie *et al.*, 1997), vírus da influenza (Ulmer *et al.*, 1993), herpesvírus bovino (Cox *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2000), *Plasmodium falciparum* (Hoffman *et al.*, 1997) e *Brucella abortus* (Rosinha *et al.*, 2002a).

Em ovinos e caprinos as pesquisas com vacinas de DNA tem envolvido parasitas como *Boophilus microplus* (De Rose *et al.*, 1999), *Taenia ovis* (Drew *et al.*, 2000), *Ehrlichia ruminantium* (Collins *et al.*, 2003) e *Cryptosporidium parvum* (Sagodira *et al.*, 1999), respectivamente, além do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) que afeta caprinos (Cheevers *et al.*, 2003).

A vacina de DNA pode ser uma estratégia efetiva na prevenção da infecção pela *C. pseudotuberculosis*, causadora da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, como indicaram os recentes experimentos com o gene da fosfolipase D modificado geneticamente. O plasmídeo contendo o gene da fosfolipase D utilizado para imunizar intramuscularmente ovinos, induziu uma proteção parcial de 70% dos animais vacinados (Chaplin *et al.*, 1999). Contudo, novos antígenos da bactéria, que induzam uma resposta imune mais eficaz e conseqüentemente maior proteção, necessitam ser identificados.

4. Vacinas de Micoorganismos Vivos Recombinantes

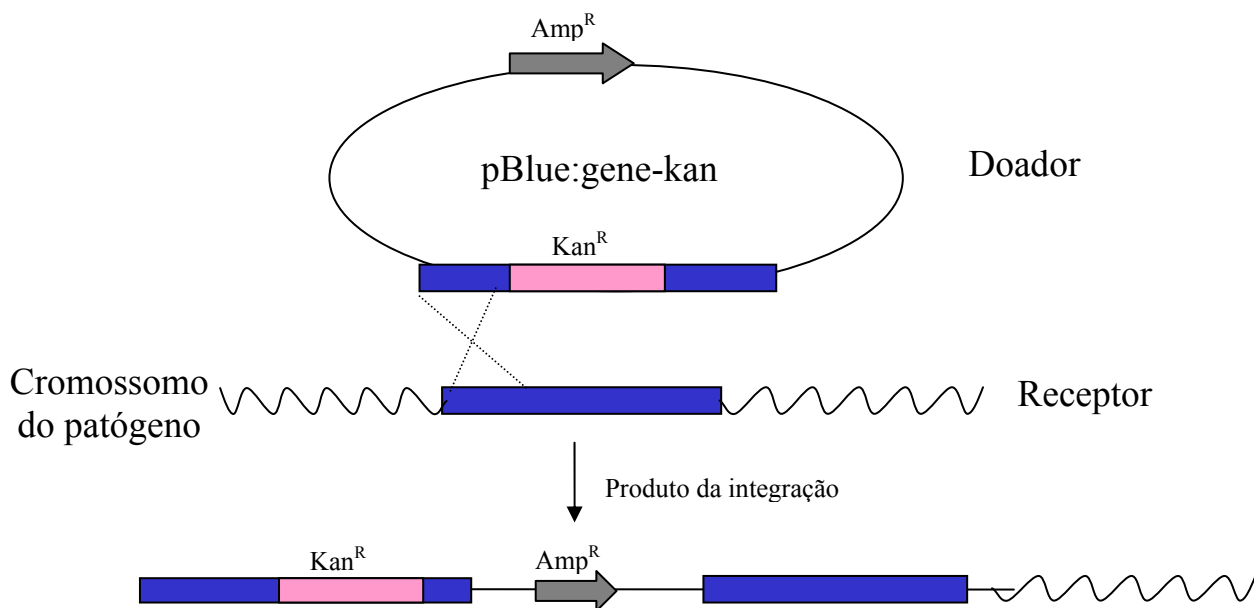
Dentre as possíveis formas de vacinas estudadas, uma estratégia que vem sendo amplamente utilizada para diferentes organismos patogênicos é a obtenção de cepas vivas atenuadas, através da deleção dirigida de genes supostamente envolvidos na virulência destes patógenos. A vacina viva atenuada possui a vantagem, em relação às outras formas de vacinas, de produzir um forte estímulo para as citocinas mais importantes no controle da infecção bacteriana, como por exemplo, IL-12 e IFN- γ .

Para a obtenção de microorganismos vivos atenuados recombinantes, podem ser utilizadas varias técnicas, sendo a mais difundida, a utilização da recombinação homóloga dupla. Para realizar a mutação do gene virulento no genoma do patógeno, é realizada a troca dos gene selvagem virulento pelo mesmo gene interrompido pelo “cassete” de canamicina, através do uso de um plasmídeo suicida. Este plasmídeo é transferido para o genoma do patógeno através de eletroporação, onde dois eventos podem ocorrer: recombinação homóloga simples ou dupla (Figura 2). Na recombinação homóloga simples, ocorre recombinação em apenas uma parte do gene, ocorrendo a integração completa do plasmídeo, e as bactérias tornam-se resistentes a canamicina e ampicilina. Na recombinação homóloga dupla, o plasmídeo sofre recombinação em duas regiões do gene, o que leva a uma troca total do gene selvagem virulento pelo gene mutado, sendo estas bactérias canamicina resistentes e ampicilina sensíveis. As colônias onde a recombinação homóloga dupla ocorreu (aqui denominadas duplo recombinantes) são as desejadas, visto que ocorre a troca do gene selvagem pelo gene mutado, sem a consequente produção da proteína alvo. Estes clones duplo recombinantes, perfazem um total de 3 % das colônias obtidas após a eletroporação. As bactérias duplo recombinantes obtidas por esta técnica, são testadas e poderão ser posteriormente utilizadas como vacinas vivas geneticamente deletadas, após devidos testes e validações.

A construção de uma cepa mutante de *Pseudomonas aeruginosa*, através da deleção do gene *aroA* do seu genoma, resultou numa potencial candidata à vacina intranasal contra este patógeno (Priebe *et al.*, 2002). Mutações neste gene, o qual codifica uma enzima essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos, tem também sido utilizada para a obtenção de cepas vacinais atenuadas para vários outros patógenos, incluindo espécies de *Salmonella* (Stocker, 1988) e *Aeromonas hydrophila* (Hernanz *et al.*, 1998). A cepa viva atenuada de *P. aeruginosa* mostrou-se altamente avirulenta em camundongos, sendo eliminada do pulmão destes animais 4 dias após a vacinação intranasal, ao contrário quando da inoculação da cepa virulenta que causa a morte destes animais em 72 horas. Além da atenuação, esta cepa foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos opsonizantes e proteger contra o desafio com a cepa virulenta da *P. aeruginosa* (Priebe *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de vacinas vivas deletadas tem sido avaliado para muitos outros patógenos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (Pavelka & Jacobs, 1999), *Salmonella typhimurium* (Straaten *et al.*, 2001), além da *Brucella abortus* (Rosinha *et al.*, 2002b).

A- Recombinação homóloga simples



B- Recombinação homóloga dupla

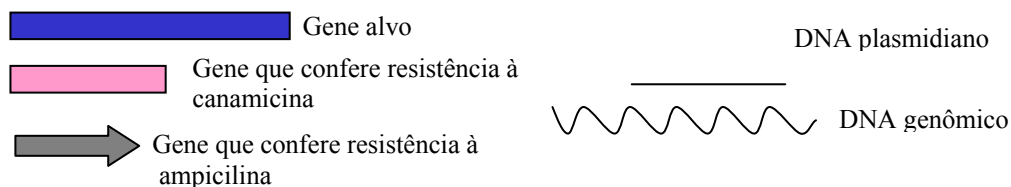
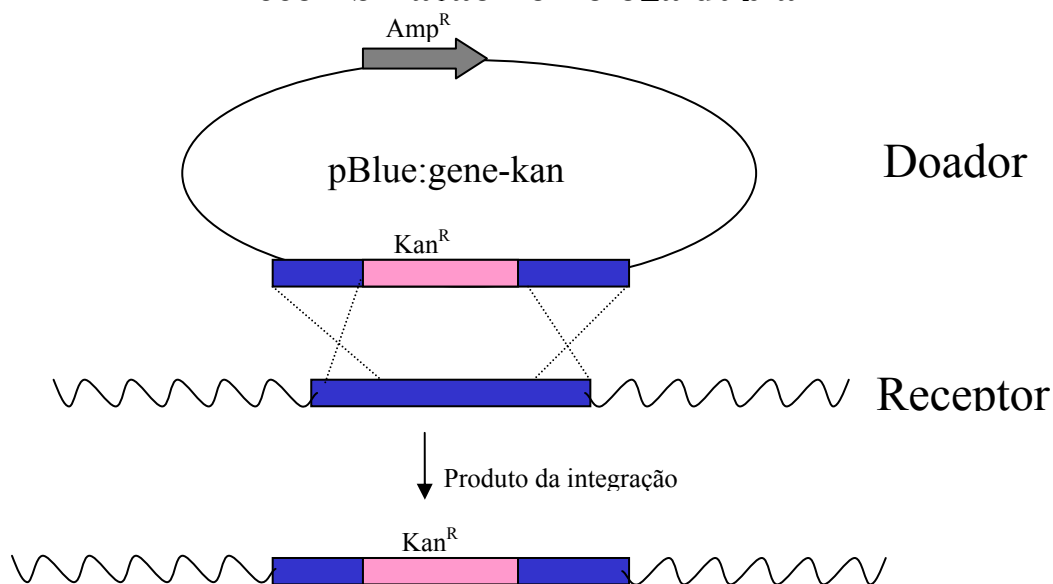


Figura 2. Esquema dos eventos de recombinação homóloga simples e dupla que ocorrem após a introdução de plasmídeos suicidas no genoma de patógenos, para o desenvolvimento de vacinas de microorganismos vivos recombinantes.

Esta estratégia utilizada na construção de cepas vivas atenuadas através da deleção de um ou mais genes de um determinado patógeno, além do uso destas como vacinas vivas deletadas, tem também sido proposta a utilização destas cepas como vetores que expressam antígenos protetores de outros patógenos, constituindo uma cepa vacinal híbrida. Pode-se citar como exemplo disto, a construção da cepa viva atenuada da *S. typhimurium* contendo um plasmídeo expressando antígenos do vírus da hepatite B humana (Tacket *et al.*, 1997) e também o uso de vacinas vivas deletadas de *Bordetella pertussis* utilizada como vetor para produzir antígenos contra várias infecções virais e bacterianas (Mielcarek *et al.*, 2000).

Com o advento da era genômica, através do conhecimento completo das informações genéticas de um microorganismo, poderemos identificar genes isolados ou “cluster” de genes e estudar seu papel na virulência de determinados patógenos e, posteriormente avaliar o potencial de novas cepas mutantes como vacinas para um importantes doenças que acometem caprinos, ovinos, bovinos, suínos, entre outros rebanhos (Weinstock, 2000).

5. Considerações Finais

Além do campo da vacinologia, a biotecnologia molecular possui outras inúmeras aplicações na área animal, em diferentes fases de desenvolvimento, porém não menos importantes. Dentre elas pode-se citar o uso de marcadores moleculares para a detecção de genótipos superiores, desenvolvimento de testes de diagnósticos moleculares, através do uso da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), conservação de recursos genéticos, testes de paternidade animal além da clonagem e transgênese animal, entre outras.

A transgênese animal abrange basicamente quatro principais linhas de pesquisa: i) a utilização de animais transgênicos como biofábricas, para a produção em larga escala de proteínas expressas no leite ou no sangue; ii) estudos da regulação e expressão gênica, onde animais transgênicos tem sido utilizados para a elucidação dos mecanismos moleculares que controlam a expressão e a regulação de diversos genes, durante o desenvolvimento fetal e em tecidos adultos; iii) estudos biomédicos e xenotransplantes, no estudo dos mecanismos moleculares que contribuem para a patologia de doenças humanas e a utilização de animais transgênicos como doares de órgãos, que expressem fatores de inibição à rejeição a transplantes, respectivamente e, iv) introdução de novas características genéticas importantes economicamente, com o objetivo de produzir animais transgênicos que apresentem características de importância comercial, tais como maior eficiência na conversão alimentar, maior quantidade de proteína na carne, maior taxa de crescimento corporal, maior produção de carcaça e maior resistência a doenças (Ribeiro, 2001).

O avanço tecnológico nas áreas de biologia molecular e bioinformática tem contribuído para o avanço na pesquisa genômica, permitindo o rápido sequenciamento de genomas de interesse. Através do desenvolvimento da genômica, que é uma nova área da biologia que surgiu devido ao sequenciamento em larga escala, pode-se obter informações valiosas sobre os sistemas biológicos da maioria dos seres vivo, incluindo animais, humanos, plantas e microorganismos. O conhecimento do genoma dos animais dos principais rebanhos economicamente importantes como ovinos, bovinos, suínos e aves facilitará a dissecação da arquitetura genética das características poligênicas como

ganho de peso, eficiência alimentar, balanço energético, fertilidade e resistência à doenças (Bertani *et al.*, 2003). Ademais, aliada a era genômica surgiu recentemente a era proteômica. A análise proteômica permite saber se e quando um determinado produto genético está sendo expresso, a concentração relativa deste produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nestas proteínas após a sua tradução.

A análise proteômica vai muito além da listagem de proteínas de um determinado ser vivo, ela pode fornecer indícios substanciais quanto à organização e à dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização através dos quais as células se desenvolvem. Ademais, a análise proteômica pode mostrar como estes processos se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica. Com isto, existe a possibilidade através do conhecimento dos proteomas da identificação de novos alvos farmacológicos, novas moléculas bioativas e marcadores biológicos que poderão ser usados para diagnósticos clínicos de doenças animais e humanas (Pimenta, 2003).

6. Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. Vacinas de DNA: o paradigma das vacinas gênicas. **Biociência**, v.5, p.40-43, 1998.
- BALLAS, Z. K.; RASMUSSEN, W. L.; KRIEG, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **Journal of Immunology**, v.157, p.1840-1845, 1996.
- BERTANI, G. R.; LEDUR, M. C.; OSORIO, F. A. A Utilização da Genômica na Investigação da Resistência Genética à Doenças do Suíno. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2003, Goiânia. **Resumos...** XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, , p.95-102, 2003.
- DAVIS, H. L. Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.635-640, 1997.
- CHAPLIN, P. J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J. S.; MCWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J. M.; LEW, A. M.; SCHEERLINCK, J. P. Targeting Improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v.67, p.6434-6438, 1999.
- CHEEVERS, W. P.; SNEKVIK, K. R.; TRUJILLO, J. D.; KUMPULA-MCWHIRTER, N. M.; PRETTY ON TOP, K. J.; KNOWLES, D. P. Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. **Virology**, v.306, p.116-125, 2003.
- CORDEIRO, L. A. M. Biotecnologia e Transgênicos: histórico e aplicações na agricultura. Disponível em: http://www.unainet.com.br/agropecuaria/coluna_do_campo_003.htm. Acesso em 10 agosto de 2004. 2000.
- COLLINS, N. E.; PRETORIUS, A.; VAN KLEEF, M.; BRAYTON, K. A.; ALLSOPP, M. T.; ZWEYGARTH, E.; ALLSOPP, B. A. Development of improved attenuated and nucleic acid vaccines for heartwater. **Developmental Biology (Basel)**, v.114, p.121-136, 2003.

- COX, G. J.; ZAMB, T. J.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. **Journal of Virology**, v.67, p.5664-5667, 1993.
- DE ROSE, R.; MCKENNA, R. V.; COBON, G.; TENNENT, J.; ZAKRZEWSKI, H.; GALE, K.; WOOD, P. R.; SCHEERLINCK, J. P.; WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.71, p.151-160, 1999.
- DREW, D. R.; LIGHTOWLERS, M. W.; STRUGNELL, R. A. A comparison of DNA vaccines expressing the 45W, 18k and 16k host-protective antigens of *Taenia ovis* in mice and sheep. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.76, p.171-181, 2000.
- GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Genetic Vaccines and Therapy**, v.1, p.1-5, 2003.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Annual Review Immunology**, v.18, p.927-974, 2000.
- HANLON, L.; ARGYLE, D. J. The science of DNA vaccination. **Infectious Disease Review**, v.3, p.2-12, 2001.
- HERNANZ, M. C.; FLANO, C. E.; LOPEZ, F. P.; VELLENA, C. A.; ANGUITA, C. J.; CASCON, S. A.; SANCHEZ, S. M.; RAZQUIN, P. B.; NAHARRO, C. G. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophyla* aroA gene and potential use of an auxotrophic aroA mutant as a live attenuated vaccine. **Infection and Immunity**, v.66, p.1813-1821, 1998.
- HOFFMAN, S. L.; DOLEN, D. L.; DEDEGAH, M.; AGUIAR, J. C.; WANG, R.; MALIK, A.; GRAMZINSKI, R. A.; WEISS, W. R.; HOBART, R.; NORMAN, J. Á.; MARGALITH, M.; HEDSTROM, R. C. Strategy for development of a pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* DNA vaccine for human use. **Vaccine**, v.15, p.842-845, 1997.
- IBGE. Anuário Estatístico do Brasil, Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=t&o=2>>. 2001. Acesso em 24 out. 2003.
- KIM, J. J.; AYYAVOO, V.; BAGARAZZI, M. L.; CHATTERGOON, M. A.; DANG, K.; WANG, B.; BOYER, J. D.; WEINER, D. B. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. **Journal of Immunology**, v.158, p.816-826, 1997.
- LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L.; COLSTON, M. J.; RAGNO, S.; TASCAN, R. E. Protection against tuberculosis by plasmid DNA vaccine. **Vaccine**, v.15, p.834-838, 1997.
- MIELKAREK, N.; NORDSTRÖM, I.; MENOZZI, F. D.; LOCHT, C.; HOLMGREN, J. Genital Antibody Responses in Mice after Intranasal Infection with an Attenuated Candidate Vector Strain of *Bordetella pertussis*. **Infection and Immunity**, v.8, p.485-491, 2000..
- ODA, L.; GRUNEWALDT, V. Divulgação Científica da Biotecnologia no Brasil como Estratégia para a Aceitação Social de Novo Paradigma tecnológico. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOSSEGURANÇA, 2003, Recife. **Resumos...** Congresso Brasileiro de Biossegurança, p.129-147, 2003.

- OLIVEIRA S. C.; ROSINHA G. M.; DE-BRITO C. F.; FONSECA C. T.; AFONSO R. R.; COSTA M. C.; GOES A. M.; RECH E. L.; AZEVEDO V. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.207-214, 1999.
- PAVELKA, M. S.; JACOBS, W. R. Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.4780-4789, 1999.
- PIMENTA, A. M. C. Os Desafios do Proteoma. **Ciência Hoje**. v.32, p.16-22, 2003.
- PRIEBE, G. P.; BRINIG, M. M., HATANO, K.; GROUT, M.; COLEMAN, F. T.; PIER, G. B.; GOLDBERG, J. B. Construction and Characterization of a Live, Attenuated *aroA* Deletion Mutant of *Pseudomonas aeruginosa* as a Candidate Intranasal Vaccine. **Infection and Immunity**, v.70, p.1507-1517, 2002.
- RIBEIRO, L. A. Animais Transgênicos. In: **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Editores Técnicos Luciana Correia de Almeida Regitano e Luiz Lehmann Coutinho. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.151-177, 2001.
- ROBINSON, H. L. Nucleic acid vaccines: an overview. **Vaccine**, v.18, p.785-787, 1997.
- ROBINSON, H.L.; TORRES, C.A. DNA vaccines. **Semin. Immunology.**, v.9, p.271-283, 1997.
- ROBINSON, H. L.; BOYLE, C. A.; FELTQUATE, D. M.; MORIN, M. J.; SANTORO, J. C.; WEBSTER, R. G. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin and nucleoprotein expressing DNAs. **Journal Infection Disease**, v.176, p.50-55, 1997.
- ROMAN, M.; MARTIN-OROZCO, E.; GOODMAN, J. S.; NGUYEN, M. D.; SATO, Y.; RONAGHY, A.; KORNBLUTH, R. S.; RICHMAN, D. D.; CARSON, D. A.; RAZ, E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. **Natural Medicines**, v.3, p.849-854, 1997.
- ROSINHA G. M.; MYIOSHI A.; AZEVEDO. V.; SPLITTER G. S.; OLIVEIRA S. C. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. **Journal of Medical Microbiology**, v.51, p.1 - 11, 2002a.
- ROSINHA, G. M. S.; FREITAS, D.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; CAMPOS, E.; CRAVERO, S.; ROSSETI, O.; SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S. C. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette (ABC) transporter homolog to *Rhizobium meliloti* *exsA* and its role in virulence and protection in mice. **Infection and Immunity** , v.70, n.9, p.5036 - 5044, 2002b.
- SAGODIRA, S.; BUZONI-GATEL, D.; IOCHMANN, S.; NACIRI, M.; BOUT, D. Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. **Vaccine**, v.17, p.2346-2355, 1999.
- SILVA, C. Vacina Gênica contra a Tuberculose. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/tuberc/tuberc3.htm>>. 1999. Acesso em 22 outubro de 2001.
- SPARWASSER, T.; KOCH, E. S.; VABULAS, R. M.; HEEG, K.; LIPFORD, G. B.; ELLWART, J. W.; WAGNER, H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG

- oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v.28, p.2045-2054, 1998.
- STOCKER, B. A. Auxotrophic *Salmonella typhi* as live vaccine. **Vaccine**, v.6, p.141-145, 1988.
- STRAATEM, T. V. D.; DIEPEN, A. V.; KWAPPENBERG, K.; VOORDEN, S. V.; FRANKEN, K.; JANSSEN, R.; KUSTERS, J. G.; GRANGER, D. L.; DISSEL, J. T. V. Novel *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Protein That Is Indispensable for Virulence and Intracellular Replication. **Infection and Immunity**, v.69, p.7413-7418, 2001.
- TACKET, C. O.; KELLY, S. M.; SCHÖDEL, F.; LOSONSKY, G.; NATARO, J. P.; EDELMAN, R.; LEVINE, M. M.; CURTISS, R. Safety and Immunogenicity in Humans of an attenuated salmonella typhi Vaccine Vector Strain Expressing Plasmid-Encoded Hepatitis B Antigens Stabilized by the Asd-Balanced Lethal Vector System. **Infection and Immunity**, v.65, p.3381-3385, 1997.
- ULMER, J.; DONELLY, J. J.; PARKER, S. E.; RHODES, G. H.; FELGNER, P. L.; DWARKI, V. J.; GROMKOWSKI, S. H.; DECK, R. R.; DEWIT, C. M.; FRIEDMAN, A.; HAWE, L. A.; LEANDER, K. R.; MARTINEZ, D.; PERRY, H. C.; SHIVER, J. M.; MOTGOMERY, D. L.; LIU, M. A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, v.259, p.1745-1749, 1993.
- ULMER, J. B.; SADOFF, J. C.; LIU, M. A. DNA vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v.8, p.531-536, 1996.
- WAINE, G. J.; MCMANUS, D. P. Nucleic Acids: Vaccines of the Future. **Parasitology Today**, v.11, p.113-116, 1995.
- WEINSTOCK, G. M. Genomics and bacterial pathogenesis. **Genomics**, v.6, p.496-504, 2000.
- WOLFF, J. A.; LUDTKE, J. J.; AXSADI, G.; WILLIAMS, P.; JANI, A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. **Human Molecular Genetics**, v.1, p.363-369, 1992.