

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC**  
**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano**

**Fernanda Martins Rodrigues**

**Pelotas, 2014**

**Fernanda Martins Rodrigues**

**Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Tiago Collares  
Orientador de estágio: Prof. Dr. Lawrence B. Schook

**Dados de catalogação na fonte:**

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB - 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

R696s Rodrigues, Fernanda Martins

Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano / Fernanda Martins Rodrigues. – 66f. :il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014. Orientadores Tiago Veiras Collares, Lawrence B. Schook, orientadores.

1. Suínos. 2. Genômica comparativa. 3. Modelo biomédico. 4. Câncer. I. Collares, Tiago Veiras. II. Schook, Lawrence B. III. Título.

CDD : 636.4082

Fernanda Martins Rodrigues

Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 15/07/2014

Banca examinadora:

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (Orientador).  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Priscila Marques Moura de Leon  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Fabiana Kömmling Seixas  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais,  
meus maiores exemplos.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Roger e Berenice, por todo apoio, compreensão, amor e amizade incessantes durante essa jornada. Meu porto seguro. Amo vocês!!

A toda minha família por sempre terem torcido por mim, compreendido minha ausência e compartilhado comigo meus sonhos. Vocês fazem parte dessa vitória!

A minha irmã, Virgínia Rodrigues, por ter compartilhado comigo meus sonhos e compreendido minha ausência.

Aos meus avós, Virgínia e Reneu Rodrigues, por estarem sempre ao meu lado, dividindo comigo todos os momentos.

A minha madrinha, tia, amiga e segunda mãe, Rosane Rodrigues, por me apoiar em todos os momentos, aconselhar quando preciso e por compartilhar comigo todos os meus sonhos, alegrias e tristezas.

Ao meu padrinho, Rogério Rodrigues, por todo amor e apoio.

Ao Prof. Dr. Tiago Collares, por ter despertado e fomentado a minha paixão pela ciência, por todas as oportunidades, carinho e amizade.

A todo grupo GPO, pelos ensinamentos e conquistas.

Ao meu orientador da UIUC, Prof. Dr. Lawrence B. Schook, pela grande oportunidade e por todos os aprendizados.

A todo grupo GPO, pelos ensinamentos e conquistas.

Ao Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, pelo apoio acadêmico e administrativo nessa jornada.

Aos Professores Fábio Leivas Leite e Odir Dellagostin, pela confiança e primeiras oportunidades de estágio.

Ao Centro de Biotecnologia, junto a todos seus profissionais e colegas, pela companhia e ajuda durante a minha graduação.

As amigas e colegas, Carolina Magalhães, Fernanda Valiati e Mariana Brustchin, por formarem, além de um grupo de seminários fantástico, um grupo de amigas que levarei no coração pelo resto da minha vida.

A amiga e colega, Júlia Sallaberry, por toda amizade, amor e bons conselhos.

A toda a turma atbiotec2013, por terem feito destes, os melhores quatro anos da minha vida.

A amiga, Fernanda Trindade da Rosa, pelo companheirismo e amizade durante minha jornada no exterior.

As amigas, e também segunda família, Andressa Reichow, Jamile Matar, Luiza Crochemore, Mariana Grassi, Natália Porto e Vitória Azevedo, por todo apoio, compreensão, amizade e amor, e por compartilharem comigo todos os momentos. Sem vocês eu não chegaria até aqui. Amo vocês!!

**Muito Obrigada!!!**

## Resumo

RODRIGUES, Fernanda Martins. **Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano**. 2014. 66f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Tradicionalmente, roedores – principalmente camundongos – são os animais mais utilizados como modelos biomédicos para o estudo de doenças humanas. Durante décadas, roedores imunologicamente comprometidos enxertados com células tumorais humanas e, mais recentemente, camundongos geneticamente modificados, têm sido os únicos modelos animais para o estudo e melhor compreensão do câncer, bem como para testes pré-clínicos de novos agentes terapêuticos para a doença. Apesar das diversas vantagens oferecidas por esses animais, tem se tornado evidente que os modelos biomédicos atuais para o estudo do câncer humano não refletem a fisiopatologia da doença bem o suficiente para prever a eficácia de novos agentes terapêuticos e dispositivos médicos em ensaios clínicos. Diferenças genéticas, anatômicas e fisiológicas entre humanos e roedores são evidentes e se refletem em diferenças no metabolismo de fármacos e no processo de tumorigênese entre as espécies, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novos modelos animais que melhor reflitam o processo de tumorigênese e a fisiologia humana. Nesse sentido, os suínos têm sido amplamente estudados como uma alternativa aos modelos animais atuais para o estudo do câncer. Há décadas, os suínos são utilizados como modelos para diversas doenças, uma vez que esses animais apresentam maiores similaridades anatômicas, genéticas e fisiológicas com humanos quando comparados aos roedores. A obtenção da sequência completa do genoma suíno foi um fator chave para o desenvolvimento desse animal como modelo biomédico. Estudos de genômica comparativa evidenciam a alta similaridade entre os genomas de suínos e humanos, bem como semelhanças no metabolismo de drogas e processo de tumorigênese, demonstrando o potencial desses animais como novo modelo para o câncer humano. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo abordar, sob a forma de uma revisão bibliográfica, as vantagens dos suínos como modelo biomédico, as tecnologias disponíveis atualmente para a produção desses modelos, e os avanços obtidos até então com relação à geração de suínos como modelos animais para o estudo do câncer humano. Embora uma série de avanços já tenham sido obtidos, o uso dos suínos como modelos biomédicos para o câncer ainda é uma ideia nova na comunidade científica. A utilização desses animais aparece como uma abordagem promissora para a melhor compreensão da doença e desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas mais eficazes. Sendo assim, mais pesquisas são necessárias a fim de promover o uso dos suínos como alternativa aos modelos de câncer atuais.

**Palavras-chave:** suínos; genômica comparativa; modelo biomédico; câncer.



## Abstract

RODRIGUES, Fernanda Martins. **Swine as biomedical models for the study of human cancer**. 2014. 66p. Final Project (Biotechnology Undergraduate Program) - Bachelor of Biotechnology, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

Traditionally, rodents – especially mice – have been the most used animals as biomedical models for the study of human diseases. For decades, immunocompromised rodents engrafted with human tumor cells, and more recently, genetically modified mice, have been the only animal models available for the study and understanding of cancer, as well as for pre-clinical testing of new drugs. Despite the several advantages offered by these animals, it has become evident that current human cancer biomedical models do not reflect the pathophysiology of the disease well enough to predict the efficacy of new therapeutic agents and medical devices in clinical trials. Genetic, anatomical, and physiological differences between humans and rodents are evident, leading to differences in drug metabolism and tumorigenesis between the two species and suggesting the need for the identification and development of new animal models that better reflect tumorigenesis and human physiology. The pig has been widely studied as an alternative to current human cancer animal models. Compared to rodents, the pigs share greater anatomical, physiological and genetic similarities with humans, being currently used as models for several human diseases. The completion of the swine genome was a key factor for the development of these animals as biomedical models. Comparative genomics studies have shown a high similarity between human and swine genomes, as well as similarities in drug metabolism and tumorigenesis, highlighting the potential of these animals as new models of human cancer. Thus, this study aimed to address the advantages of using pigs as biomedical models, the currently available technologies for the production of such models, and the recent advances regarding the generation of porcine models for the study of human cancer. Although several progresses have been achieved, such an approach is still not well developed in the scientific community. The use of pigs as biomedical models of cancer appears as a promising approach to better understand the disease and to the development of more effective therapeutic strategies. Hence, further research is needed in order to promote the use of the pig as an alternative to current animal models of cancer.

**Key words:** swine; comparative genomics; biomedical model; cancer.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1 Introdução .....  | 10 |
| 2 Modelos animais na pesquisa biomédica .....                             | 12 |
| 2.1 Histórico e Importância .....   | 12 |
| 2.2 Conceito de modelo animal .....                                       | 19 |
| 2.3 Tipos de modelos animais para o estudo de doenças.....                | 20 |
| 2.4 A escolha do modelo animal adequado.....                              | 23 |
| 3 Câncer .....  | 27 |
| 3.1 Incidência, estimativas e fatores de risco.....                       | 27 |
| 3.2 A biologia do câncer.....   | 28 |
| 3.3 Modelos animais para o estudo do câncer humano .....                  | 30 |
| 4 Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano .....       | 37 |
| 4.1 O genoma suíno .....  | 40 |
| 4.2 Tecnologias atuais para o desenvolvimento de suínos transgênicos..... | 41 |
| 4.3 Modelos suínos emergentes para o estudo do câncer humano .....        | 45 |
| 4.3.1 Suínos como modelos para o estudo do câncer epitelial .....         | 45 |
| 4.3.2 Suínos como modelos para o estudo de gliomas .....                  | 46 |
| 4.3.3 Um modelo suíno inespecífico para o estudo do câncer humano .....   | 47 |
| 5 Considerações Finais .....  | 49 |
| Referências.....  | 51 |

## 1 Introdução

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Comparativa localizado no Departamento de Ciências Animais da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign (UIUC), Estados Unidos, onde, com o auxílio da Bolsa de Graduação Sanduíche do Programa Ciências Sem Fronteiras concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pude realizar meu estágio curricular obrigatório e desenvolver o presente Trabalho de Conclusão de Curso sob orientação do Prof. Dr. Lawrence B. Schook (orientador de estágio) e do Prof. Dr. Tiago Collares (orientador acadêmico).

A genômica comparativa consiste na análise comparativa de genomas de diferentes espécies ou linhagens biológicas a fim de estudar a estrutura, organização e evolução dos genomas e espécies correspondentes, bem como as funções dos genes e regiões não-codificantes nestes genomas, permitindo a compreensão das bases genéticas de determinados fenótipos e, ainda, a identificação de genes, grupos de genes e/ou alterações gênicas associadas a doenças e infecções (VIANA, 2006; MUSHEGIAN, 2007). Assim, as principais linhas de pesquisa do Laboratório de Genômica Comparativa da UIUC envolvem o uso da genômica comparativa para a criação de novos modelos animais de uso biomédico com o intuito de auxiliar no estudo e compreensão de doenças humanas complexas, como o câncer.

Tradicionalmente, roedores – principalmente camundongos e ratos – são os modelos mais amplamente utilizados para o estudo de doenças humanas (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Durante décadas, roedores imuno-comprometidos enxertados com

células humanas e, mais recentemente, camundongos geneticamente modificados, têm sido os únicos modelos animais para o estudo e melhor compreensão do câncer, bem como para testes pré-clínicos de novos agentes terapêuticos para a doença (KUZMUK; SCHOOK, 2011; WALTERS, et al., 2012). No entanto, apesar dos baixos custos de manutenção, grande tamanho de ninhada, curto tempo de vida, e da liberdade de manipulação genética desses animais, tem se tornado evidente que os modelos animais atuais para o estudo do câncer não refletem a fisiopatologia do câncer humano bem o suficiente para prever a eficácia de novos agentes terapêuticos e dispositivos médicos em ensaios clínicos para a doença (ADAM, et al., 2007). Diferenças genéticas, anatômicas e fisiológicas entre humanos e roedores são evidentes e se refletem em diferenças no metabolismo de fármacos e no processo de tumorigênese entre as espécies, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novos modelos animais que melhor reflitam o processo de tumorigênese e a fisiologia humana (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Nesse sentido, umas das principais linhas de pesquisa do Laboratório de Genômica Comparativa da UIUC consiste no estudo de suínos como uma alternativa aos modelos animais atuais para o estudo do câncer humano. Há décadas, os suínos são utilizados como modelos para diversas doenças humanas, uma vez que esses animais apresentam maiores similaridades anatômicas, genéticas e fisiológicas com humanos quando comparados aos roedores. A obtenção da sequência completa do genoma suíno foi um fator chave para o desenvolvimento e aceitação desse animal como modelo biomédico (SCHOOK, et al., 2005a). A alta similaridade entre os genomas de suínos e humanos, bem como similaridades no metabolismo de drogas e processo de tumorigênese, demonstram o potencial desses animais como novo modelo para o câncer, mais semelhante aos seres humanos (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Assim, este trabalho tem por objetivo abordar, sob a forma de uma revisão bibliográfica, as vantagens dos suínos como modelo biomédico para o câncer, as tecnologias disponíveis atualmente para a produção desses modelos, bem como expor os avanços obtidos até então com relação à geração de suínos como modelos animais para o estudo do câncer humano.

## **2 Modelos animais na pesquisa biomédica**

### **2.1 Histórico e Importância**

A experimentação animal tem desempenhado um papel importante na pesquisa biomédica ao longo da história, sendo os modelos animais utilizados em, praticamente, todos os campos da biomedicina. Essencialmente, todos os avanços obtidos em termos de conhecimento médico e desenvolvimento de novos tratamentos para doenças, como o desenvolvimento de vacinas, antibióticos para doenças infecciosas, novos fármacos, e, ainda, melhor compreensão de doenças complexas, envolveram e envolvem estudos desenvolvidos em animais de uso em laboratório (FRANCO, 2013).

Os humanos (*Homo sapiens*) têm utilizado outras espécies de vertebrados como modelos para o estudo da anatomia, fisiologia e enfermidades humanas desde os primórdios da medicina (FRANCO, 2013). O uso de animais em pesquisas pode ser datado no século VI a.C. na Grécia antiga, quando estudiosos como Alcmeão de Crotona (século VI – século V a.C.), Aristóteles (século IV a.C), Herófilo (século IV – século III a.C), entre outros, devido aos tabus existentes acerca da dissecação de corpos humanos, realizavam a vivissecação de animais para o estudo de anatomia (MAEHLE; TROEHLER, 1987; VON STADEN, 1989; COURT, 2005). Tais estudiosos tiveram grande influência mais tarde, no século II d.C., sobre os estudos realizados por Galeno de Pérgamo, um físico e filósofo grego o qual viria a se tornar a principal

autoridade médica durante séculos e o qual acredita-se ser o fundador da fisiologia experimental no mundo ocidental (FRANCO, 2013).

As pesquisas de Galeno eram realizadas quase inteiramente em macacos e porcos, nos quais desenvolveu, a um nível sem precedentes, técnicas de dissecação e vivissecação de animais (GUERRINI, 2003; KUZMUK; SCHOOK, 2011; FRANCO, 2013). Galeno, bem como outros estudiosos na Grécia antiga, acreditava que a natureza poderia ser entendida a partir da exploração e da experimentação, e que o conhecimento médico assim obtido era de relevância clínica direta. Equivocadamente, Galeno assumiu que os humanos eram idênticos a outros animais em sua anatomia e funções corporais, e que toda a informação obtida a partir de seus experimentos poderia ser diretamente aplicada aos humanos. No entanto, apesar de seus estudos terem uma abordagem experimental, suas interpretações dos processos fisiológicos a partir das vivissecações eram, na maioria das vezes, imprecisas, levando-o a cometer uma série de erros (GUERRINI, 2003; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

A autoridade de Galeno, somada à proibição dogmática pela Igreja de dissecações pós-morte do corpo humano, mantiveram esses erros incontestáveis e despercebidos até meados do século XVI, quando o anatomista belga Andreas Vesalius observou, a partir de seus trabalhos como médico e cirurgião, que diversas estruturas anatômicas observadas em outros animais não estavam presentes no corpo humano (O'MALLEY, 1964; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Suas observações levaram Vesalius a agir contra as regras civis e religiosas estabelecidas e dissecar cadáveres humanos ilegalmente, publicando descrições acuradas da anatomia humana. Além disso, também analisou as diferenças e similaridades entre as estruturas internas de humanos e outros animais, lançando as bases para o que hoje chamamos de “anatomia comparativa” e revolucionando o estudo da anatomia (FRANCO, 2013).

Mais tarde, em meados do século XVII, William Harvey, um fisiologista ocidental, anatomista comparativo e um dos fundadores da ciência moderna, também contrariou as ideias de Galeno. Em 1628, Harvey publicou o livro *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* (“Um Exercício Anatômico no Movimento do Coração e Sangue de Seres Vivos”), onde, utilizando os resultados de experimentos em animais vivos, forneceu uma descrição precisa da circulação sanguínea e função

cardíaca de seres vivos para aquela época, refutando as ideias de Galeno (MCMULLEN, 1995; GREGORY, 2001). Harvey, bem como outros pesquisadores da época, mudou o estudo da fisiologia. A fisiologia do século XVII marcou o início da ciência moderna. Experimentos em animais provam ser mais informativos e relevantes para a obtenção do conhecimento científico acerca de processos biológicos básicos, diminuindo a importância da medicina dogmática de Galeno e abrindo caminho para a medicina baseada em evidências dos dias de hoje (FRANCO, 2013).

No século XVIII, alguns marcos relevantes da ciência biomédica com base em estudos com animais podem ser destacados, como a fundação da farmacologia experimental e da embriologia moderna (ROE, 1981; MAEHLE, 1999; FRANCO, 2013). Já no início do século XIX, a medicina passava por uma grande revolução. O reconhecimento pela comunidade médica de que a maioria de suas práticas eram baseadas em crenças e tradições não comprovadas, e de que a maior parte das terapias existentes eram, não só ineficazes, mas também, muitas vezes, prejudiciais aos pacientes, mudou o foco da medicina. Agora, a medicina passa a dar mais atenção à melhor compreensão das patologias e dos processos de progressão de doenças, buscando por melhores diagnósticos e prognósticos e dando mais credibilidade aos pesquisadores, vistos na época com desdém (BYNUM, 1994). Além disso, outro tipo de revolução médica estava ocorrendo nos laboratórios, originando a ciência básica consistente na qual a medicina moderna do século XX viria a se basear e dando maior relevância aos experimentos com animais para responder perguntas científicas (FRANCO, 2013).

No século XIX, os experimentos com animais passam a ser cada vez mais solicitados a fim de desenvolver novas abordagens terapêuticas para doenças que acometiam os humanos. Nessa época, uma série de cientistas se destacaram por seus trabalhos, como o famoso fisiologista francês Claude Bernard que, em 1865, publicou o livro *Introdução ao Estudo da Medicina Experimental*, onde estabeleceu o marco da medicina experimental (NORMANDIN, 2007). Em seu livro, Bernard defende a indução química e física de doenças em situações experimentais, levando assim à criação do que hoje chamamos de “modelos animais induzidos” na pesquisa biomédica, bem

como também enfatiza a aplicabilidade dos experimentos realizados com animais para os seres humanos (NORMANDIN, 2007; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Já na transição do século XIX para o século XX, surge Louis Pasteur, um cientista francês o qual ajudou a estabelecer e popularizar a pesquisa científica bem como o uso de animais de experimentação. Pasteur, juntamente ao cientista alemão Robert Koch, a partir de estudos em animais, introduziram a “teoria dos germes” das doenças infecciosas (ULLMANN, 2007; FRANCO, 2013). Em seus estudos, Pasteur levantou a hipótese de que muitas doenças que acometiam humanos e outros animais poderiam ser causadas por micróbios patogênicos. Com o auxílio de outros pesquisadores, identificou uma série de patógenos, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium septicum*, *Bacillus anthracis*, *Pasteurella multocida*, sendo o primeiro a desenvolver vacinas para essas doenças a partir de experimentos em animais (BAZIN, 2011). Koch proporcionou uma série de avanços no campo da medicina a partir de suas pesquisas. Lançou os “postulados de Koch”, de grande importância no campo da microbiologia, e identificou os agentes causadores da tuberculose (*Micobacterium tuberculosis*, também conhecido como “bacilo de Koch”) e do cólera (*Vibrio cholera*), promovendo o desenvolvimento de modelos animais para doenças infecciosas e seu uso para a avaliação de fármacos antibacterianos (BROCK, 1999; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

O século XX foi marcado por uma série de avanços surpreendentes na pesquisa biomédica, trazendo diversos benefícios para a saúde humana e animal. A pesquisa com animais contribuiu com mais da metade desses avanços e, durante alguns períodos, foi responsável por mais de 75% das principais descobertas. Como prova disso, dentre todos os prêmios Nobel distribuídos desde o ano de 1901, dois terços foram concedidos a trabalhos envolvendo pesquisas em modelos animais (AMP; FBR). A descoberta de vitaminas, hormônios, antibióticos, técnicas seguras de transfusão sanguínea, vacinas novas e mais seguras, insulina, quimioterapia e radioterapia para o tratamento do câncer, avançados métodos de diagnóstico e técnicas cirúrgicas, entre outros, são alguns exemplos desses avanços que ajudaram a salvar pessoas e animais e proporcionar uma melhor qualidade de vida para a população (FBR; RDS).



Nesse mesmo século, os roedores ganham destaque como modelos animais em pesquisas, especialmente devido ao seu tamanho reduzido, fácil manuseio, baixo custo de manutenção, curto tempo de vida e rápida taxa de reprodução, sendo o rato doméstico (*Rattus norvegicus*) a primeira espécie de roedores utilizada na pesquisa científica (FRANCO, 2013). Sua utilização teve início no ano de 1828, mas foi apenas no século XX, após o desenvolvimento da primeira linhagem de ratos padrão (a linhagem *Wistar*), que se tornaram a ferramenta preferida da pesquisa biomédica (SUCKOW; WEISBROTH; FRANKLIN, 2006; FRANCO, 2013). O camundongo (*Mus musculus*), também ganhou popularidade no século XX, sendo considerado um modelo privilegiado para o estudo da genética após a descoberta da estrutura do DNA em 1953 por James Watson e Francis Crick. (WATSON; CRICK, 1953; KUZMUK; SCHOOK, 2011)

No final do século XX e início do século XXI, é observada a possibilidade de se utilizar modelos animais naturais, resultantes da ocorrência de mutações espontâneas – camundongos imunodeficientes portadores de imunodeficiência combinada severa (SCID) – e de se produzir modelos animais geneticamente modificados através de técnicas como transgênese e recombinação homóloga sítio-dirigida (PANTELOURIS, 1968). Além disso, a possibilidade de clonagem de animais através do uso de células-tronco embrionárias ou transferência nuclear de célula somática permitiu a seleção de animais com características fenotípicas similares às daquelas de humanos como modelos biomédicos (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Nessa época, alguns avanços importantes são obtidos, como: o desenvolvimento do primeiro camundongo transgênico por John Gordon e Frank Ruddle em 1981 (GORDON; RUDDLE, 1981); a geração do primeiro animal transgênico como modelo para o estudo de tumores, desenvolvido a partir da introdução de um oncogene viral (antígeno T do vírus SV40) em oócitos de camundongos (BRINSTER, et al., 1984); a geração do primeiro camundongo *knockout* para um gene em 1989 por Mario R. Capecchi, Martin J. Evans e Oliver Smithies, pesquisa que lhes concedeu o Prêmio Nobel em 2007 (ABBOTT, 2007); e a realização de pesquisas para o desenvolvimento de um canino como modelo para o estudo do câncer de próstata (WATERS, et al., 1998).

O surgimento de tecnologias de sequenciamento de DNA na década de 70 e a possibilidade de sequenciamento de genomas inteiros de animais com similaridades fisiológicas com humanos – como roedores e, mais recentemente, suínos – revolucionou a pesquisa biomédica, fornecendo ferramentas potenciais para o desenvolvimento de modelos animais geneticamente e fenotipicamente mais similares aos humanos para o estudo de doenças (FRANCO, 2013; GROENEN, et al., 2012; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Por exemplo, no ano de 2002, o camundongo se tornou o segundo mamífero, depois dos seres humanos, a ter todo o seu genoma sequenciado (WATERSTON, et al., 2002), fazendo deste o modelo animal mais utilizado para o estudo de doenças e ensaios clínicos de novas abordagens terapêuticas (FRANCO, 2013).

Durante a transição entre os séculos XX e XXI, o aumento na incidência de doenças crônicas – como o câncer – causadas por interações genéticas e ambientais complexas, bem como a identificação de diferenças significativas na anatomia, fisiologia e genética entre humanos e os modelos animais de doenças utilizados até então, estimulou ainda a mais a busca por modelos animais mais semelhantes aos humanos e que melhor refletissem a anatomia e fisiologia humana, bem como o desenvolvimento e progressão de doenças (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Conforme mencionado anteriormente, a possibilidade de sequenciamento de genomas inteiros de espécies animais trouxe uma nova perspectiva à pesquisa biomédica. O conhecimento de sequências genômicas de diferentes espécies abre espaço para a genômica comparativa, cujo estudo permite identificar e estudar genes homólogos existentes entre diferentes espécies, facilitando, assim, a identificação de novos modelos animais, mais específicos e que melhor representem a anatomia e fisiologia humana (SWANSON, 2004; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Nesse sentido, no século XXI, novas espécies animais ganham destaque na pesquisa biomédica, como os suínos. Devido a uma série de similaridades fisiológicas, anatômicas e, principalmente, genéticas (GROENEN, et al., 2012) entre suínos e humanos, esses animais passam a ser vistos como ferramentas potenciais para o estudo da anatomia e fisiologia humana, bem como para a melhor compreensão de doenças e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas

(SCHOOK, et al., 2005a). Dentre as enfermidades humanas estudadas em suínos, podemos mencionar: fibrose cística (ROGERS, et al., 2008; WELSH, et al. 2009); doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (JENSEN, et al., 2010), bem como o sistema cardiovascular como um todo (LASKE; SKADSBERG; IAIZZO, 2005); diabetes melito (UMEYAMA, et al., 2009); doença de Alzheimer (KRAGH, et al., 2009); entre outras (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Os suínos também têm sido explorados no estudo da estrutura e fisiologia intestinal (QIU, et al., 2006) e como potenciais doadores de órgãos para xenotransplantes (COOPER; GOLLACKNER; SACHS, 2002). Além disso, esses animais têm sido amplamente estudados como modelos para o estudo do câncer humano, uma doença complexa considerada um problema de saúde mundial (OMS). No ano de 2007, pesquisadores conseguiram induzir a formação de tumores sólidos em suínos geneticamente modificados (ADAM, et al., 2007). Atualmente, uma série de estudos têm sido realizados a fim de desenvolver modelos suínos, específicos e inespecíficos, para o estudo do câncer humano (VAN KRANEN; MULLENDERS, 2001; KUZMUK; SCHOOK, 2011; WALTERS, et al., 2012; DE GRUIJL; RODRIGUES, 2013; RUND; 2013).

Como se pode perceber, o uso de animais na pesquisa biomédica tem desempenhado um papel fundamental até os dias atuais. A compreensão de doenças humanas é difícil, envolvendo uma série de fatores e interações complexas que devem ser considerados para o completo entendimento do processo de desenvolvimento e progressão de uma doença. Atualmente, embora diversos avanços tenham sido alcançados na pesquisa biomédica, uma série de questões ainda precisam ser respondidas. Visto isso, a busca pela melhor compreensão das enfermidades humanas é constante e, conseqüentemente, a busca pelo desenvolvimento de melhores modelos animais como ferramentas para esses estudos tem se intensificado, demonstrando a importância do uso de animais na pesquisa científica.

## 2.2 Conceito de modelo animal

Etimologicamente, a palavra “animal” deriva do Latim *animal*, que significa alma, espírito, respiração, assim descrevendo seres que vivem e que estão animados, que possuem sensibilidade e movimento próprio (FERREIRA, 2010). A palavra “modelo” pode ser definida como: um objeto de imitação; algo que represente alguma coisa ou alguém com precisão; algo que seja semelhante ou a imagem de outro (FAGUNDES; TAHA, 2004; FERREIRA, 2010). Assim, unindo as duas definições, um “modelo animal” seria um objeto animado de imitação, uma imagem do homem ou outras espécies, utilizado para investigar uma condição fisiológica e/ou patológica de interesse (FAGUNDES; TAHA, 2004).

O termo “modelo animal” está geralmente relacionado à modelagem de humanos, embora modelos animais também sejam utilizados para o estudo de outras espécies de animais. O foco da pesquisa não está na imagem do animal utilizado como modelo, mas na analogia do comportamento fisiológico deste animal para a espécie humana. Assim, nesse contexto, seria mais correto utilizar o termo "modelos humanos", uma vez que “modelos animais” consiste em um termo mais amplo, que pode ser aplicado à modelagem de outras espécies (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Nesse sentido, alguns autores preferem utilizar o termo “modelos biomédicos” para se referir a modelos animais utilizados para o estudo de condições fisiológicas e patológicas humanas. Modelos biomédicos podem, então, ser definidos como “substitutos para um ser humano, ou sistema biológico humano, que podem ser usados para compreender o funcionamento normal e anormal do gene ao fenótipo e para proporcionar as bases para o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas para doenças humanas” (TUMBLESON; SCHOOK, 1997; NRC, 1998; SWANSON, 2004).

### 2.3 Tipos de modelos animais para o estudo de doenças

Os modelos animais, independentemente de sua espécie, podem ser classificados em 5 categorias: a) modelos animais espontâneos (genéticos); b) modelos animais negativos; c) modelos animais órfãos; d) modelos animais induzidos; e e) modelos animais geneticamente modificados (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

#### a) *Modelos animais espontâneos*

Uma das formas de estudar uma doença humana consiste em caracterizar uma doença de ocorrência natural em uma espécie animal que corresponde àquela doença em humanos. Os modelos animais espontâneos se baseiam nessa estratégia. São modelos de doenças humanas que utilizam variantes genéticas (mutantes) que ocorrem naturalmente na natureza (FAGUNDES; TAHA, 2004; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Um exemplo famoso de modelo animal espontâneo é um tipo de camundongo portador de deficiências imunológicas adquiridas geneticamente - o chamado camundongo atímico (ou nude) – cujo desenvolvimento representou um marco no estudo de tumores hetero-transplantados e permitiu a primeira descrição das células assassinas naturais (*natural killer*) (PANTELOURIS, 1968; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Os modelos animais espontâneos disponíveis são, em sua maioria, roedores – principalmente camundongos e ratos -, embora uma grande variedade de mutantes naturais tenham sido descritos em outras espécies. Os modelos animais espontâneos foram muito importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças humanas, uma vez que os mesmos são, geralmente, isomórficos, ou seja, exibem uma semelhança fenotípica entre a doença no animal e a doença correspondente nos humanos, o que muitas vezes se reflete em reações semelhantes para o tratamento no modelo animal e no paciente humano (CONN, 2008).

No entanto, quando o objetivo de estudo consiste em avaliar a etiologia e as causas genéticas de uma determinada enfermidade, os modelos animais espontâneos

não apresentam muitas vantagens. A maioria dos genes são homólogos entre humanos e outras espécies de animais (HAU; VANHOOSIER, 2010). Alterações nesses genes podem levar à inativação ou ativação de outros genes, e até mesmo à alteração de processos metabólicos envolvidos em doenças. Além disso, esses processos metabólicos podem, obviamente, diferir entre humanos e a espécie animal utilizada como modelo. Assim, outros tipos de modelos que melhor reflitam as causas genéticas de uma doença, os processos metabólicos nela envolvidos, e que mais se assemelhem à espécie humana são necessários (CONN, 2008; HAU; VANHOOSIER, 2010).

#### *b) Modelos animais negativos*

Os modelos de doenças infecciosas são geralmente restritos a um número limitado de espécies susceptíveis ao desenvolvimento dessas doenças quando expostos aos seus agentes patogênicos. As espécies restantes, não susceptíveis ao desenvolvimento de tais doenças, são consideradas modelos negativos para aquele patógeno (HAU; VANHOOSIER, 2010).

Modelos animais negativos são caracterizados por não desenvolverem determinada patologia quando expostos a certos estímulos (HAU, 2008). Por exemplo, coelhos não desenvolvem a infecção gonocócica quando expostos a um tratamento experimental com o agente causador da doença que induz o desenvolvimento da mesma em outras espécies animais (FAGUNDES; TAHA, 2004). Modelos negativos também incluem os animais que demonstram falta de reatividade a um estímulo específico. Tais modelos são muito usados em pesquisas acerca dos mecanismos de resistência desses animais que os tornam não susceptíveis a determinadas doenças ou condições (FAGUNDES; TAHA, 2004; HAU, 2008).

#### *c) Modelos animais órfãos*

Um modelo órfão de uma doença descreve uma condição, um distúrbio funcional, que ocorre naturalmente em espécies animais não-humanas, mas que ainda não foi descrita em humanos. Quando uma condição análoga àquela descrita no

modelo órfão é identificada também na espécie humana, ela é então “adotada” como sendo também uma condição humana. Como exemplos, pode-se mencionar a doença de Marek, a Papilomatose e a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), também chamada de “doença da vaca louca” (CONN, 2008; HAU; VANHOOSIER, 2010).

#### *d) Modelos animais induzidos*

Nos modelos animais induzidos, a condição a ser estudada é induzida experimentalmente em animais saudáveis através de intervenções cirúrgicas, modificações genéticas ou indução química (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Esse tipo de modelo animal foi descrito em 1918, quando Yamagiwa e Ichikawa demonstraram que a aplicação experimental de alcatrão de hulha na orelha de coelhos levava ao desenvolvimento de carcinomas de pele nesses animais (YAMAGIWA; ICHIKAWA, 1918).

A maioria dos modelos induzidos são parciais ou isomórficos, uma vez que a etiologia de uma doença induzida experimentalmente num animal é diferente da etiologia da mesma doença em seres humanos. Assim, poucos modelos induzidos conseguem representar a etiologia, curso e patologia de uma doença de forma acurada (HAU, 2008).

#### *e) Modelos animais geneticamente modificados*

Os modelos animais geneticamente modificados consistem em animais manipulados geneticamente através de técnicas de engenharia genética a fim de adquirir características desejadas de acordo com o propósito para o qual este modelo será utilizado. Esses são talvez os modelos mais importantes para a pesquisa biomédica, e foram criados a fim de melhor compreender e identificar modificações genéticas comumente encontradas em doenças humanas (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Modelos animais geneticamente modificados podem ser gerados de diversas formas como: pela deleção ou inativação de um gene específico (*knockout*); pela inserção de uma sequência de DNA exógeno (transgênese) a partir de técnicas como

microinjeção pró-nuclear, transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME), transferência nuclear de células somáticas (TNCS), uso de vetores virais para a transferência de DNA exógeno, entre outras; pela indução de mutações em genes endógenos através de agentes químicos e/ou físicos; entre outros métodos. O uso de uma abordagem específica varia dependendo do uso pretendido para aquele modelo animal (CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011; SANDERS, 2012).

#### **2.4 A escolha do modelo animal adequado**

A hipótese de que os humanos são idênticos a outros animais nas suas funções corporais acarretou em uma série de erros durante a história da medicina. A seleção do modelo animal adequado influencia diretamente na significância e validade dos resultados obtidos nesse animal e, principalmente, na capacidade de extrapolação desses resultados para as espécies-alvo (humanos, por exemplo), sendo o conhecimento de anatomia comparativa, fisiologia comparativa e, ainda, genômica comparativa, de extrema importância para a escolha e desenvolvimento de um modelo animal adequado (KUZMUK; SCHOOK, 2011; SWANSON, 2004; VIANA, 2006).

A seleção do modelo animal depende de uma série de fatores importantes. O fator chave para o uso de animais no estudo de doenças é que os resultados obtidos possam ser aplicados em humanos. Modelos animais de doenças só são relevantes se conseguirem representar o processo de desenvolvimento de uma doença de forma acurada e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas (HAU, 2008; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Dessa forma, para garantir a plena utilização de um modelo na pesquisa biomédica, este deve representar fielmente a anatomia e fisiologia normal de órgãos e tecidos humanos, bem como representar acuradamente os aspectos morfológicos e bioquímicos envolvidos na patogênese de uma doença (HAU, 2008; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Um modelo animal para o câncer, por



exemplo, deve sofrer os processos de desenvolvimento e progressão tumoral de forma semelhante ao que ocorre em humanos (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

No passado, os animais eram tradicionalmente usados para a identificação de um gene ou genes responsáveis por determinada doença, sendo utilizadas duas estratégias para o estudo de doenças humanas e escolha do modelo animal adequado (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Uma estratégia caracteriza completamente a doença clínica humana e escolhe o modelo animal mais apropriado de acordo com características anatômicas e/ou fisiológicas, questões práticas relativas ao animal (como características físicas e comportamentais, requisitos de habitação, custo, facilidade de manejo), questões éticas, leis e restrições; enquanto a outra se trata da caracterização de um modelo mutante de ocorrência natural ou induzido (por exposição a agente químicos ou radiação) e a identificação de qual doença humana poderia ser nele estudada (SWANSON, 2004).

Embora esses métodos tenham proporcionado uma série de avanços no campo da medicina, selecionando modelos tradicionais – como roedores – para o estudo de diversas doenças humanas, eles apresentam falhas intrínsecas que limitam a sua relevância para a medicina clínica (SWANSON, 2004; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Diferenças anatômicas e fisiológicas entre a espécie escolhida como modelo e a espécie-alvo podem levar à geração de informações enganosas acerca de doenças, bem como sobre testes clínicos de fármacos. Por exemplo, devido ao baixo custo e questões éticas envolvidas, o rato é comumente utilizado para o teste pré-clínico de fármacos para uma série de patologias. No entanto, uma vez que os ratos não possuem uma enzima homóloga à enzima CYP3A4 humana (responsável pelo metabolismo de diversos fármacos para o tratamento de doenças), os resultados obtidos nesses animais não preveem com precisão como seria a resposta humana ao fármaco em teste (SOUCEK; GUT, 1992; SWANSON, 2004), demonstrando a necessidade de desenvolvimento de modelos animais mais precisos e a importância da seleção do modelo animal adequado para uso em pesquisas biomédicas.

Atualmente, os modelos animais são selecionados de outra forma, não sendo mais utilizados para a identificação de um gene ou genes responsáveis por determinado fenótipo. O advento de novas técnicas de biologia molecular, genômica,

transgênese e clonagem tem permitido aos pesquisadores utilizar os modelos animais para melhor compreender os efeitos causados por alterações genéticas, bem como determinar a função de um gene e predizer o fenótipo de uma célula, tecido ou organismo (HAU, 2008).

Avanços no campo da genômica, proteômica, biotecnologia e bioinformática modificaram a pesquisa biomédica. A partir do Projeto Genoma Humano, obteve-se informações genéticas não apenas da espécie humana, mas também de animais tradicionalmente utilizados como modelos para o estudo de doenças (SWANSON, 2004; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Assim, surge o conceito de genômica comparativa, que consiste na análise comparativa de genomas de diferentes espécies ou linhagens biológicas a fim de estudar a estrutura, organização e evolução dos genomas e espécies correspondentes, bem como as funções dos genes e regiões não-codificantes nestes genomas, permitindo a compreensão das bases genéticas de determinados fenótipos e, ainda, a identificação de genes, grupos de genes e/ou alterações gênicas associadas a doenças e infecções (VIANA, 2006; MUSHEGIAN, 2007).

O estudo da genômica comparativa fornece abordagens eficazes na identificação dos fatores genéticos e ambientais responsáveis por doenças complexas e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas (SWANSON, 2004; VIANA, 2006; MUSHEGIAN, 2007). A partir desses estudos, é possível identificar e estudar genes homólogos existentes entre diferentes espécies, bem como extrapolar de forma mais precisa e segura informações obtidas a partir de experimentos com animais para os seres humanos e vice-versa (SWANSON, 2004). Técnicas de genômica comparativa, bem como de proteômica comparativa, podem ser usadas para a identificação de funções de genes e proteínas e de interações envolvidas no desenvolvimento de doenças. Ainda, permitem a criação de novos modelos animais, mais específicos, que melhor representem a anatomia e fisiologia humana, bem como o desenvolvimento e progressão de doenças (SWANSON, 2004; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Assim, a genômica comparativa acrescentou novos critérios importantes para a seleção de modelos animais adequados. Além de representar o processo de desenvolvimento de uma doença de forma acurada, representar a anatomia e fisiologia

normal de órgãos e tecidos humanos, e reproduzir fielmente os aspectos morfológicos e bioquímicos envolvidos na patogênese de uma doença, um modelo animal também deve: a) ser passível de manipulações genéticas; b) possuir seu genoma sequenciado ou em processo de sequenciamento; c) apresentar características práticas (por exemplo, tempo curto de reprodução, tamanho reduzido, fácil manejo e baixo custo de manutenção); e d) possuir características únicas que simplifiquem a análise do problema biológico de interesse (BARR, 2003; SWANSON, 2004).

### **3 Câncer**

#### **3.1 Incidência, estimativas e fatores de risco**

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo um problema de saúde mundial alvo de inúmeras pesquisas ao redor do mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), há uma estimativa de aumento de 50% nos casos de câncer até o ano de 2030, quando serão diagnosticados em todo o mundo cerca de 22 milhões de ocorrências em comparação com os 14 milhões registrados no ano de 2012. Além disso, as mortes por câncer passarão de 8,2 milhões a 13 milhões por ano (OMS). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam uma estimativa de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer para o período de 2014 a 2015 (INCA, 2014).

A transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é o resultado de uma interação entre fatores genéticos do indivíduo acometido e três categorias de agentes externos, incluindo: 1) agentes carcinogênicos físicos (radiação ultravioleta e ionizante); 2) agentes carcinogênicos químicos (amianto, componentes de fumaça do tabaco, arsênico, entre outros); e 3) agentes carcinogênicos biológicos (infecções causadas por vírus, bactérias ou parasitas) (OMS). Segundo a OMS e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), os principais fatores de risco

relacionados ao desenvolvimento do câncer são tabagismo, consumo de álcool, alimentação inadequada e sedentarismo. Além desses, infecções crônicas pelo vírus da hepatite B (VHB), vírus da hepatite C (VHC) e alguns tipos de vírus do papiloma humano (VPH) podem ser considerados fatores de risco para o câncer em países de média e baixa renda. Ainda, o envelhecimento é outro fator relacionado ao desenvolvimento da doença (IARC; OMS).

### **3.2 A biologia do câncer**

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças complexas caracterizadas pelo crescimento celular desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do organismo (metástase) (INCA). Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, podendo levar à formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Em contrapartida, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam lentamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente oferecendo um risco de vida (INCA; WEINBERG, 2008). De modo geral, os cânceres podem ser classificados em: carcinomas, que consistem em neoplasias originárias de tecidos epiteliais; sarcomas, os quais são neoplasias originárias de tecidos conjuntivos, de preenchimento ou de sustentação; leucemias, que são neoplasias originárias da medula; e linfomas, que consistem em neoplasias originárias de tecidos linfoides (INCA; OMS).

O câncer é uma doença genética que pode estar associada a alterações em genes específicos, não sendo uma doença hereditária na maioria dos casos. Seu desenvolvimento se dá, geralmente, a partir de alterações genéticas no DNA de uma célula somática durante o período de vida do indivíduo acometido que conferem a essas células a capacidade de proliferação descontrolada, havendo um desequilíbrio entre a proliferação celular (ciclo celular) e a apoptose (morte celular programada). Esses eventos são controlados por uma grande quantidade de genes que, ao sofrerem

mutações, podem ter seus produtos expressos de maneira alterada, iniciando a formação de um tumor (WEINBERG, 2008).

A maioria das mutações que estão relacionadas ao desenvolvimento de tumores ocorrem em duas grande classes de genes que codificam proteínas envolvidas no controle do crescimento e proliferação celular: os oncogenes (por exemplo, Ras) e os genes supressores tumorais (por exemplo, p53) (VIDEIRA, et al., 2002; WEINBERG, 2008). Os tumores, em sua maioria, apresentam mutações que acarretam na inativação de genes que atuam em diversos pontos de verificação do ciclo celular, ou seja, que param o ciclo celular em caso de ocorrência de erros ou lesões no DNA em alguma etapa do ciclo. Os genes supressores tumorais são esses genes de verificação. Eles atuam como “freios” das células, codificando proteínas que retardam o crescimento celular e impedem as células de se tornarem malignas (WEINBERG, 2008).

Já os oncogenes têm função contrária aos genes supressores de tumor. Os oncogenes são genes derivados de genes chamados proto-oncogenes, os quais, ao sofrerem mutações, são ativados se transformando em oncogenes. Os oncogenes são responsáveis por aumentar a proliferação celular e inibir a apoptose, eventos que dão início ao processo de tumorigênese (VIDEIRA, et al., 2002). Esses genes codificam proteínas que promovem o crescimento celular descontrolado e, conseqüentemente, a conversão de uma célula normal em uma célula tumoral. Assim, ao contrário dos genes supressores, os oncogenes atuam como “aceleradores” das células, estimulando a proliferação celular descontrolada e a formação de tumores (VIDEIRA, et al., 2002; WEINBERG, 2008).

O comportamento do câncer humano, especialmente aqueles de potencial invasivo (como tumores de mama, próstata, cólon, entre outros), pode variar muito, uma vez que estes podem iniciar rapidamente um processo de metástase ou ainda levar vários anos para adquirir potencial invasivo (IARC; WEINBERG, 2008). Além disso, o crescimento e manutenção de tumores depende, além das mutações genéticas envolvidas, de interações ambientais complexas e de uma série de outros fatores, como de interações celulares dentro de um microambiente tridimensional composto por fatores de crescimento, hormônios, moléculas de adesão, bem como uma matriz

extracelular complexa, demonstrando a natureza dinâmica, progressiva e complexa do câncer humano (KIMLIN; CASAGRANDE; VIRADOR, 2013).

Assim, o desenvolvimento de modelos para o estudo da biologia do câncer e desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas deve levar em consideração toda essa complexidade e fatores envolvidos no desenvolvimento da doença.

### **3.3 Modelos animais para o estudo do câncer humano**

Devido à complexidade das inúmeras doenças que chamamos câncer e devido à necessidade de melhores tratamentos, fármacos e melhor entendimento dos fatores envolvidos na doença, bem como do processo de tumorigênese como um todo, inúmeros esforços têm sido empregados nas últimas décadas para a compreensão do câncer e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e preventivas (PANTALEÃO; LUCHS, 2010).

Os modelos animais representam ferramentas importantes para o estudo da patogênese de doenças humanas e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas apropriadas. Nesse sentido, diversos modelos animais para o estudo do câncer têm sido desenvolvidos, uma vez que esses são sistemas vivos comparativos que servem como ferramentas para o melhor entendimento de como o câncer se desenvolve, do porquê tumores primários adquirem potencial metastático, e de como estratégias de prevenção e tratamento podem ser empregadas a fim de interromper a progressão do câncer, impedindo o crescimento e disseminação de tumores e prolongando a vida do paciente (eMICE-NCI).

Conforme já mencionado anteriormente, a escolha do modelo animal adequado depende de uma série de fatores. Para o câncer, um modelo animal deve representar a complexidade da doença e seus aspectos envolvidos, sofrendo os processos de desenvolvimento e progressão tumoral de forma semelhante aos humanos (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Existem diversos modelos animais disponíveis para o estudo dessa

doença em uma ampla variedade de espécies, sendo os roedores – especialmente os camundongos – as espécies mais utilizadas (SWANSON, 2004).

O camundongo (*Mus musculus*) consiste em um dos modelos mais utilizados para o estudo do câncer devido a uma série de vantagens que este animal oferece, como tamanho reduzido, curto tempo de vida (aproximadamente 3 anos), fácil reprodução em cativeiro, bom tamanho de ninhada e fácil manuseio (FREESE; TUVESON, 2007). Além disso, o camundongo foi o primeiro mamífero a ter seu genoma completamente sequenciado, disponibilizando informações genéticas que motivaram ainda mais seu uso como modelo animal para o câncer e outras doenças humanas (WATERSTON, et al., 2002; FREESE; TUVESON, 2007).

Embora os camundongos ainda apresentem limitações na modelagem do câncer devido a diferenças espécie-específicas e à recapitulação imprecisa do processo de tumorigênese, o uso desses animais como modelos para o estudo dessa doença tem proporcionado uma melhor compreensão acerca da biologia do câncer humano e, mais recentemente, acerca dos fatores genéticos relacionados ao câncer (eMICE-NCI; FREESE; TUVESON, 2007; CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011). Dentre os modelos disponíveis para o câncer, podemos mencionar os camundongos imunologicamente comprometidos enxertados com células tumorais humanas (xenotransplante) e os camundongos geneticamente modificados (FREESE; TUVESON, 2007).

O desenvolvimento de modelos a partir da técnica de xenotransplantes consiste na implantação de linhagens celulares tumorais humanas cultivadas *in vitro* – ou células tumorais humanas derivadas de explantes tumorais – na região subcutânea de camundongos imunologicamente comprometidos e posterior avaliação da capacidade de formação de tumores ao longo do tempo (eMICE-NCI; FREESE; TUVESON, 2007). Dentre os exemplos do uso desses modelos para o estudo do câncer, temos: a criação de uma linhagem altamente tumorigênica e metastática de melanoma humano para o estudo do crescimento, metástase e expressão de moléculas em camundongos atímicos (VAN MUIJEN, et al., 1991); o estudo do tratamento hormonal em implantes de linhagens tumorais de mama em camundongos atímicos, os quais não apresentam linfócitos T maduros (CLARKE, 1996); a criação de camundongos modelo para o câncer pancreático – desenvolvidos a partir do implante de células tumorais derivadas



de pacientes com esse tipo de câncer – para sua utilização como ferramentas de seleção e desenvolvimento de novos fármacos e biomarcadores (RUBIO-VIQUEIRA, et al., 2006); entre outros exemplos.

Esses tipos de modelos foram, e ainda são, de grande importância para o conhecimento atual acerca da biologia do câncer, embora pareçam não mimetizar a progressão tumoral de forma adequada. Diferenças cruciais entre xenotransplantes tumorais e amostras derivadas de pacientes podem ser observadas. Características do microambiente tumoral são perdidas ou alteradas, como, por exemplo, os tecidos normais circundantes ao tumor, células do estroma, vascularização e circulação linfática, e células do sistema imune (BECHER; HOLLAND, 2006). Essas características são de extrema importância para o processo de formação e progressão tumoral, e sua perda pode invalidar o uso desses modelos para a avaliação, por exemplo, de compostos terapêuticos, uma vez que não conseguem representar de forma acurada o processo de tumorigênese, não havendo possibilidade de uma extrapolação segura dos resultados obtidos nos animais para os humanos (FREESE; TUVESON, 2007).

Os camundongos geneticamente modificados são os modelos animais que mais têm contribuído para o nosso conhecimento acerca da biologia do câncer (CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011). As primeiras tentativas de modificações genéticas em camundongos para o estudo do câncer ocorreram na década de 1980 objetivando a geração dos “*oncomice*”: camundongos transgênicos geneticamente modificados para a expressão de oncogenes dominantes e, conseqüentemente, desenvolvimento de tumores (HANAHAN; WAGNER; PALMITER, 2007). Nessa época, o desenvolvimento de tecnologias de geração de animais transgênicos e da técnica de direcionamento gênico (*gene-targeting*) em células-tronco embrionárias de camundongos motivou a prática da engenharia genética nesses animais, gerando modelos para o estudo do processo de tumorigênese através da manipulação de linhagens celulares germinativas (eMCE-NCI; HANAHAN; WAGNER; PALMITER, 2007).

Dentre as estratégias de geração de modelos de camundongos geneticamente modificados, a mais comum consiste na ativação ou inserção de oncogenes, ou inativação (ou remoção) de genes supressores tumorais (ou ambos) *in vivo* através do

uso de técnicas chamadas *knockin* e *knockout* gênico, respectivamente. A maior parte do conhecimento que temos atualmente acerca do papel desempenhado pelos oncogenes e genes supressores tumorais, de suas funções biológicas, bem como das vias de sinalização envolvidas no processo tumoral, foi obtida a partir de estudos em camundongos modelo produzidos a partir dessas técnicas, permitindo a construção do conceito atual de metástase (KIM; BAEK, 2010). Por exemplo, um estudo realizado por Arbeit et al. (1993) demonstrou que camundongos geneticamente modificados para a superexpressão dos oncogenes E6 e E7 do vírus do papiloma humano (VPH) apresentam carcinogênese de células neuroepiteliais e desenvolvem tumores cerebrais entre os 4 e 10 meses de idade, contribuindo para o conhecimento atual acerca do papel da superexpressão de oncogenes na indução de tumores. Outro exemplo pode ser o desenvolvimento de camundongos heterozigotos ou deficientes para o gene supressor tumoral p53, os quais desenvolvem tumores aos 18 meses e 4 meses e meio de vida, respectivamente, demonstrando a relação entre a inibição e/ou deleção de genes supressores tumorais e o desenvolvimento de tumores (DONEYOWER, 1996).

Vale ressaltar que as modificações genéticas que levam ao desenvolvimento tumoral, muitas vezes, requerem mais de uma alteração, e não somente a expressão de oncogenes ou inibição de genes supressores tumorais. Nesse sentido, foram desenvolvidos camundongos geneticamente modificados para a superexpressão ou remoção de mais de um gene envolvido no desenvolvimento de tumores, como, por exemplo, o desenvolvimento de linhagens de camundongos portadoras do alelo do oncogene *Kras* (PANTALEÃO; LUCHS, 2010). Esse gene consiste em uma forma mutada do proto-oncogene Ras e está relacionado ao aparecimento de diversos tumores, entre eles tumores pulmonares. Ao remover o gene p53 em camundongos modelo portadores do oncogene *Kras*, foi possível o desenvolvimento de um modelo experimental ainda mais agressivo do que aqueles possuindo apenas uma alteração gênica (JOHNSON, et al., 2001).

Outro método utilizado para a geração de camundongos geneticamente modificados para o estudo do câncer é a transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME), a qual se baseia na transfecção do DNA exógeno de interesse para o interior dos espermatozoides, os quais serão utilizados como

carreadores do transgene para os oócitos receptores, gerando assim um animal transgênico fundador (eMICE-NCI; FREESE; TUVESON, 2007; CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011). Esta técnica ainda está em processo de aperfeiçoamento e uma série de estudos têm sido realizados a fim de aprimorar a técnica de transfecção de DNA para os espermatozoides, como o uso de ferramentas de nanotecnologia (CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011).

Atualmente, camundongos transgênicos têm sido desenvolvidos a partir da técnica de microinjeção de DNA exógeno (transgene) em pró-núcleos de zigotos fertilizados, sendo o transgene integrado em sítios aleatórios do genoma do camundongo (CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011; eMICE-NCI). A expressão do transgene em algum tecido específico, ou em algum estágio específico de desenvolvimento, depende do tipo de promotor ou regulador utilizado. Alguns promotores já são bem caracterizados, como o do vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV), e são amplamente utilizados na geração de camundongos transgênicos para o estudo do câncer de mama, por exemplo (STEWART; PATTENGAL; LEDER, 1984; THEODOROU, et al., 2007).

Embora alguns promotores sejam bem descritos, essa metodologia apresenta algumas desvantagens, como a incapacidade de controle do nível e padrão de expressão do transgene, os quais variam devido aos locais de integração aleatórios no genoma. A integração aleatória do transgene pode resultar na falta de expressão do mesmo ou, ainda, num fenótipo inesperado resultante de efeitos secundários causados pela integração do transgene no genoma. Além disso, outra desvantagem consiste na disponibilidade limitada de promotores tecido-específicos, o que dificulta o desenvolvimento desses modelos para determinados tipos de câncer (FREESE; TUVESON, 2007).

Com relação à biologia do tumor, os tumores produzidos nesses modelos animais transgênicos se diferenciam dos tumores desenvolvidos no organismo humano em dois aspectos principais: 1) no camundongo transgênico, o transgene é integrado no genoma do animal, onde há duas cópias do alelo selvagem, enquanto em tumores humanos, há apenas um alelo selvagem e um mutante; 2) os camundongos transgênicos produzidos pela técnica de microinjeção pró-nuclear não conseguem

recapitular o desenvolvimento clonal e esporádico dos tumores humanos uma vez que todas as suas células tumorais expressam o transgene (FREESE; TUVESON, 2007; CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011).

Nesse sentido, uma série de estratégias tem sido desenvolvida a fim de superar essas limitações. O uso de células-tronco embrionárias transgênicas (geneticamente modificadas pela técnica de *gene targeting*) – apresentando padrões e níveis adequados de expressão do transgene – para a geração dos camundongos transgênicos, aparece com uma estratégia de controle do nível e padrão de expressão do transgene (THOMAS; CAPECCHI, 1987; FREESE; TUVESON, 2007). Os efeitos secundários causados pela integração aleatória do transgene no genoma (como o silenciamento do transgene e geração de fenótipos inesperados) podem ser evitados através do uso de isoladores, os quais consistem em sequências de DNA inseridas nas extremidades do transgene que impedem que sequências vizinhas interfiram na expressão do mesmo (GASZNER; FELSENFELD, 2006). Além disso, novas tecnologias para a geração desses animais transgênicos tem sido desenvolvidas, como o uso de cromossomos bacterianos artificiais, do inglês *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC), os quais permitem a inserção de grandes fragmentos genômicos no genoma do camundongo (CAMPOS; LEON; COLLARES, 2011). Os BACs têm sido muito utilizados para a geração dos chamados camundongos humanizados, em que ocorre a substituição de um locus genômico inteiro do genoma do camundongo por um novo locus sintético (cDNA) de humanos, permitindo a geração de camundongos transgênicos que melhor reproduzem o organismo humano e o processo de tumorigênese (eMICE-NCI; FREESE; TUVESON, 2007; PINO, et al., 2010).

A partir do exposto acima, pode-se perceber que os camundongos consistem em animais importantes para o estudo do câncer humano, tendo sido responsáveis pela maior parte do conhecimento que temos atualmente acerca do processo de desenvolvimento e progressão tumoral, bem como de fatores genéticos relacionados à doença. No entanto, devido a diferenças significativas entre esses animais e os seres humanos, os camundongos ainda não podem ser considerados modelos ideais para o estudo do câncer humano e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas. Assim, busca-se pela identificação de novas espécies, mais similares aos humanos,

que melhor reflitam sua anatomia, fisiologia, e genética, e que consigam recapitular de forma mais precisa o processo de tumorigênese.

#### **4 Suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano**

Embora os modelos animais clássicos tenham sido de extrema importância para a obtenção do conhecimento atual que temos acerca do câncer, bem como de diversas outras doenças humanas, tais modelos apresentam utilidade limitada devido à sua incapacidade de representar essas doenças de forma acurada (WALTERS, et al., 2012).

Conforme mencionado anteriormente, os roedores – principalmente camundongos – têm sido tradicionalmente utilizados como modelos animais para o estudo do câncer. No entanto, apesar dos baixos custos de manutenção, grande tamanho de ninhada, curto tempo de vida, e da liberdade de manipulação genética desses animais, tem se tornado evidente que os modelos animais atuais para o estudo do câncer não refletem a fisiopatologia do câncer humano bem o suficiente para prever a eficácia de novos agentes terapêuticos e dispositivos médicos em ensaios clínicos para a doença (ADAM, et al., 2007). Diferenças genéticas, anatômicas e fisiológicas entre humanos e roedores são evidentes e se refletem em diferenças no metabolismo de fármacos e no processo de tumorigênese entre as espécies, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novos modelos animais para o câncer que melhor reflitam o processo de tumorigênese e a fisiologia humana (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Nesse sentido, os suínos têm sido amplamente estudados como uma alternativa aos modelos animais atuais. Há décadas, os suínos são utilizados como modelos para diversas doenças, uma vez que esses animais apresentam maiores similaridades

anatômicas, genéticas e fisiológicas com humanos quando comparados aos roedores (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Em comparação com outros modelos animais de grande porte, os suínos alcançam a maturidade sexual cedo (em aproximadamente 6 – 8 meses), apresentam curto período de gestação (aproximadamente 4 meses) e grande tamanho de ninhada (WALTERS, et al., 2012). Além disso, devido à sua importância econômica e agrônômica, apresentam condições padronizadas de habitação, alimentação, manejo e cuidados de saúde, facilitando sua aplicação como animal de experimentação (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Os suínos também possuem uma grande variedade de origens genéticas, existindo diversas raças – tanto de suínos padrão como de suínos miniatura – selecionadas para prosperar em uma grande variedade de condições ambientais. Assim, as raças suínas apresentam potencial de representação dos diferentes grupos étnicos das diversas regiões ao redor do mundo, sendo modelos úteis para o estudo epidemiológico de doenças (KUZMUK; SCHOOK, 2011; WALTERS, et al., 2012).

Os suínos apresentam uma série de semelhanças estruturais, anatômicas e fisiológicas com humanos – como tamanho, padrões nutricionais, fisiologia digestiva, hábitos alimentares, estrutura e função renal, estrutura do leito vascular pulmonar, propensão à obesidade, anatomia cardiovascular, entre outras – que fazem desses animais modelos únicos e viáveis para a pesquisa biomédica (SCHOOK, et al., 2005a). Ademais, possuem longo período de vida (10 - 15 anos) apresentando processo de progressão de doenças similar ao que ocorre em humanos (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Por ser um onívoro, se mostra como um modelo adaptável para a avaliação de exposições crônicas e agudas a xenobióticos, como álcool, tabaco, aditivos alimentares e poluentes ambientais, tendo sido utilizado, por exemplo, para o estudo do alcoolismo (SCHOOK, et al., 2005a). Esses animais também são utilizados como um modelo padrão para a aterosclerose e outros estudos cardiovasculares devido a semelhanças na fisiologia e anatomia cardiovascular entre suínos e humanos (LI, et al. 2007; JENSEN, et al., 2010; SCHIMIDT, et al., 2013). Doenças do sistema digestivo também têm sido estudadas em porcos visto as semelhanças fisiológicas dos processos digestivos entre as duas espécies (HEINRITZ; MOSENTHIN; WEISS, 2013). Também

são considerados as principais espécies de interesse como doadores de órgãos para xenotransplantes devido a semelhanças fisiológicas e anatômicas de órgãos como pâncreas, fígado, rins e coração (WALTERS, et al., 2012). Além dessas doenças, os suínos são também utilizados para o estudo da fibrose cística (ROGERS, et al., 2008; WELSH, et al. 2009), diabetes melito (UMEYAMA, et al., 2009; RENNER, et al., 2010), doença de Alzheimer (KRAGH, et al., 2009), cicatrização (LUNNEY, 2007), entre outras.

Conforme mencionado anteriormente, os suínos têm se mostrado como uma alternativa atraente para o estudo da biologia do câncer e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de prevenção para essa doença. Como nos humanos, a incidência de câncer em suínos é rara, com uma prevalência de câncer infantil (tumor de Wilms em suínos jovens) e um espectro mais amplo de tipos de câncer em adultos (ANDERSON; JARRETT, 1968; BROWN; JOHNSON, 1970; KUZMUK; SCHOOK, 2011). Ainda, em comparação com os roedores tradicionalmente utilizados como modelos para o câncer, os suínos metabolizam fármacos e sofrem o processo de tumorigênese de forma mais semelhante ao que ocorre nos seres humanos (KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Por serem animais de grande porte, se apresentam como um sistema ideal para estudos acerca de técnicas cirúrgicas e quimioterápicas, bem como estudos pré-clínicos de imagem, hipertermia, radioterapia de intensidade modulada (IMRT) e terapia fotodinâmica de tumores, uma vez que a realização dessas terapias em camundongos é quase impossível devido ao tamanho reduzido dos tumores desenvolvidos nesses animais. Além disso, não há a possibilidade de uso dos aparelhos em escalas menores (KUZMUK; SCHOOK, 2011; WALTERS, et al., 2012).

As similaridades na biologia do câncer entre suínos e humanos podem ser encontradas também a nível molecular, o que pode ser demonstrado, por exemplo, pelo número reduzido de genes necessários para a transformação de uma célula humana ou suína normal em uma célula tumoral quando comparado ao número de genes necessários para a transformação de uma célula de camundongos (KANDALL, et al., 2005; ADAM, et al., 2007). Ainda, como nos humanos, a atividade da enzima telomerase de suínos também é suprimida em diversos tecidos e reativada quando da



ocorrência de câncer, indicando a presença de similaridades também no processo de tumorigênese entre as duas espécies (STEWART; WEINBERG, 2000).

Além disso, a homologia entre as sequências genômicas de humanos e suínos é bastante alta. A partir de análises de genômica comparativa, estudos observaram que o receptor X do pregnano de suínos (PXR) – proteína a qual regula o fator p450 do citocromo CYP3A4, responsável pelo metabolismo de cerca da metade de todos os fármacos de uso humano – apresenta maior similaridade com a mesma proteína de humanos em comparação com a proteína de camundongos (POLLOCK; ROGATCHEVA; SCHOOK, 2007), demonstrando, assim, o potencial do uso de suínos como modelo biomédico para o estudo pré-clínico de fármacos para o tratamento de doenças humanas, como o câncer.

#### **4.1 O genoma suíno**

O sequenciamento do genoma suíno foi completo recentemente (GROENEN, et al., 2012) a partir de um suíno doméstico fêmea da raça Duroc (*Sus scrofa*). O genoma suíno é composto por 18 cromossomos autossômicos e 2 cromossomos sexuais (cromossomos X e Y). Possui um tamanho estimado de 2.7 Gb e é aproximadamente 7% menor do que o genoma humano, enquanto os genomas de camundongos e caninos são aproximadamente 14% menores. Além disso, a partir de análises de genômica comparativa, pode-se observar uma alta taxa de homologia entre as sequências genômicas de humanos e suínos: 60% de homologia quando comparado a 40% entre humanos e roedores (HUMPHRAY, et al., 2007; GROENEN, et al., 2012; WALTERS, et al., 2012).

A obtenção da sequência completa do genoma suíno foi um fator chave para o desenvolvimento e aceitação desse animal como modelo biomédico (SCHOOK, et al., 2005b). O sequenciamento do genoma suíno colocou em cena três peças fundamentais para o uso desse animal na pesquisa biomédica: 1) genoma completo; 2) habilidade de produção de animais transgênicos; e 3) habilidade de reprodução de

modelos animais através de clonagem de células somáticas (SCHOOK, et al., 2005a). Assim, o surgimento de informações genéticas, juntamente com o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética (transgênese, por exemplo) e clonagem, proporcionaram a possibilidade de utilização do suíno como modelo para o estudo de doenças humanas (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Além disso, mutações de ocorrência natural também oferecem oportunidades para a utilização dos suínos como modelo biomédico (GROENEN, et al., 2012).

A alta similaridade entre os genomas suíno e humano, bem como outras semelhanças já abordadas anteriormente (anatômicas e fisiológicas), demonstram o potencial dos suínos como modelo biomédico para o estudo do câncer humano. Assim, uma série de pesquisas tem sido realizada para o desenvolvimento desses modelos, principalmente suínos transgênicos, como uma alternativa aos modelos de câncer atuais.

#### **4.2 Tecnologias atuais para o desenvolvimento de suínos transgênicos**

Uma série de tecnologias podem ser utilizadas para a produção de suínos transgênicos como modelos biomédicos, como: microinjeção pró-nuclear (HAMMER, et al., 1985); transdução de oócitos (CABOT, et al., 2001; PARK, et al., 2001); transdução de embriões (HOFMANN, et al., 2003; WHITHELAW, et al. 2004); transdução de fibroblastos seguida por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (PARK, et al., 2001); transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME) (LAVITRANO, et al., 2006); e transfecção de fibroblastos seguida por TNCS (CABOT, et al., 2001; PARK, et al., 2001).

O primeiro método disponível para a produção de suínos transgênicos foi a microinjeção pró-nuclear, o qual foi primeiramente estabelecido em camundongos (BRINSTER, et al., 1981). Esse método consiste na microinjeção de um fragmento de DNA de interesse no pró-núcleo de zigotos coletados a partir de uma fêmea superovulada e posterior transferência desse zigoto para o suíno receptor através de

transferência embrionária (HAMMER, et al., 1985). A microinjeção pró-nuclear é uma técnica confiável e amplamente utilizada, sendo sua principal vantagem a possibilidade de integração de grandes construções de DNA no genoma. Porém, uma de suas principais desvantagens consiste na impossibilidade de controle do sítio de integração do transgene (WALTERS, et al., 2012). Além disso, apenas 1% dos zigotos microinjetados produzem suínos transgênicos com sucesso (WHYTE; PRATHER, 2011).

Como alternativa, tem-se o método de transdução de oócitos, o qual utiliza um vírus de replicação deficiente como carreador do transgene para os oócitos suínos, apresentando uma taxa de produção de animais transgênicos mais alta do que aquela alcançada pelo método de microinjeção pró-nuclear (HOFMANN, et al., 2003). O método de TGME também tem sido utilizado para a produção de suínos geneticamente modificados, apresentando alta eficiência baseada na habilidade dos espermatozoides em internalizar e integrar o DNA exógeno durante o processo de fertilização (LAVITRANO, et al., 2006). Ambos os métodos mencionados acima são eficientes quanto à geração de suínos transgênicos. No entanto, algumas limitações são observadas, como a incapacidade de controle do sítio de integração do transgene, falta de especificidade de expressão gênica devido à falta de controle do local de integração do DNA exógeno, e o fato de que apenas a adição de DNA exógeno é permitida, não sendo possível a deleção de genes de interesse (*knockout*) (WHYTE; PRATHER, 2011; WALTERS, et al., 2012).

Atualmente, o método mais popular para a produção de suínos geneticamente modificados consiste na modificação genômica de células somáticas seguida por TNCS. Nesse método, o núcleo de uma célula somática – geralmente fibroblastos fetais suínos - é transferido a um oócito enucleado no estágio de metáfase II do ciclo celular e esse complexo é, posteriormente, ativado através de eletrofusão. Os embriões reconstruídos são, então, transferidos a receptoras sincronizadas para a gestação. Uma das principais desvantagens desse método é que, às vezes, a clonagem pode resultar na geração de animais anormais e na baixa eficiência de produção de descendentes (CARTER, et al., 2002). Além disso, os fibroblastos suínos de origem fetal, utilizados como células doadoras para a TNCS, apresentam capacidade de

proliferação limitada e baixa frequência de endereçamento de genes (*gene targeting*) quando comparadas a células tronco embrionárias disponíveis para outras espécies. No entanto, apesar das desvantagens apresentadas pela técnica de TNCS, a clonagem a partir de uma célula somática modificada consiste no único método disponível para a produção de modificações específicas em suínos, sendo que essas modificações podem ser identificadas nas células *in vitro* antes mesmo da produção do animal (PRATHER; SHEN; DAI, 2008; WHYTE; PRATHER, 2011).

A inserção de DNA exógeno nos fibroblastos suínos antes da TNCS tem sido realizada através de diversas estratégias, as quais incluem: entrega de DNA baseada em moléculas lipídicas (HYUN, et al., 2003); entrega mediada por vírus (LAI, et al., 2002; ROGERS, et al., 2008); e eletroporação (DAI, et al., 2002). Embora o uso dessas estratégias possibilitem a produção de suínos geneticamente modificados, esses métodos não permitem a integração direcionada do DNA exógeno no genoma suíno, não sendo possível prever em que sítio genômico o transgene irá se inserir e podendo haver uma série de consequências, como a geração de mutações não esperadas no genoma, silenciamento do transgene, bem como geração de animais transgênicos com características indesejadas (WALTERS, et al., 2012). Nesse sentido, a técnica de direcionamento gênico (*gene targeting*) aparece como um método mais preciso para a modificação genética dos fibroblastos fetais suínos antes da TNCS.

A técnica de *gene targeting* – descrita primeiramente em células embrionárias de camundongos (CAPECCHI, 1989) – consiste no uso de recombinação homóloga (RH) para a modificação de um gene endógeno, deleção e/ou adição de genes de interesse, remoção de exons e, ainda, introdução de mutações pontuais no genoma, podendo ser utilizada para a modificação genética de fibroblastos fetais suínos antes da TNCS (AIGNER, et al., 2010). O método de *gene targeting* pode gerar a modificação genética de forma permanente ou induzível e condicional. Uma desvantagem do uso dessa técnica para a geração de modificações genéticas permanentes – ou seja, que se expressarão incondicionalmente independente da fase da vida do animal transgênico gerado – é que muitos fenótipos (no caso da geração de um animal geneticamente modificado para o estudo de doenças, por exemplo) só se manifestam na vida adulta do organismo. Assim, quando os genes são alterados de forma permanente, essas

alterações podem se expressar durante o desenvolvimento embrionário do organismo que se está gerando, podendo levar à morte precoce do animal geneticamente modificado (SIMMONS, 2008; WALTERS, et al., 2012).

Como alternativa à geração de modificações genéticas permanentes, esforços para o desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de modificações genéticas condicionais e induzíveis têm sido feitos, a fim de reduzir o risco de morte precoce dos animais transgênicos a serem gerados. Nesse sentido, recentemente foi desenvolvido o sistema Cre/LoxP recombinase (NAGY, 2000), o qual consiste no sistema condicional mais amplamente utilizado que permite a geração de modificações genéticas de forma induzível, condicional, bem como em tecidos e estágios de desenvolvimento específicos (NAGY, 2000; WALTERS, et al., 2012). Esse sistema utiliza a enzima Cre, uma recombinase de 38 KDa encontrada no bacteriófago P1, e o sítio de recombinação LoxP, que consiste em uma sequência consenso de 34pb. O uso de dois sítios LoxP dispostos na mesma orientação permite que esses sítios removam toda e qualquer sequência por eles flanqueada quando na presença de uma enzima Cre ativa, a qual reconhece esses sítios, ativando-os e fazendo com que sofram recombinação (NAGY, 2000; SIMMONS, 2008). Assim, o sistema Cre/LoxP permite a expressão do transgene de forma tecido-específica e tempo-específica, uma vez que a modificação desejada só se manifestará onde e quando a enzima Cre recombinase estiver sendo expressa e ativa (WALTERS, et al., 2012). Esse sistema foi primeiramente descrito em camundongos. No entanto, recentemente, estudos comprovaram sua funcionalidade em células suínas sob determinadas condições fisiológicas (WALTERS, et al., 2012; RODRIGUES, 2013).

Além dessas, outras tecnologias – embora ainda em fase de estudos – têm sido recentemente utilizadas como alternativas para a produção de suínos geneticamente modificados, como a utilização das enzimas nucleases *Zinc Fingers* (ZFNs; dedos de zinco), as quais consistem em enzimas de restrição artificiais capazes de clivar a fita dupla de DNA em sítios específicos, permitindo a geração de modificações genéticas específicas de forma eficiente (REMY, et al., 2010). Por exemplo, estudos recentes demonstraram o potencial dessa tecnologia para a geração de suínos *knockout* para genes endógenos (WHYTE, et al., 2011). Além disso, alguns estudos atuais também

trazem a utilização de transposons (sequências móveis de DNA presentes no genoma) como uma abordagem promissora para a geração de suínos transgênicos (CARLSON, et al., 2011; JAKOBSEN, et al., 2011).

### **4.3 Modelos suínos emergentes para o estudo do câncer humano**

Visto as diversas vantagens que os suínos oferecem como modelos animais de uso biomédico e a necessidade de desenvolvimento de melhores modelos para o estudo do câncer humano, uma série de pesquisas têm sido realizadas acerca do desenvolvimento de modelos biomédicos suínos para o estudo do câncer. Uma vez que o uso dessa espécie como modelo para o câncer humano é uma hipótese recente no mundo científico, os modelos apresentados aqui são modelos emergentes, ou seja, ainda estão em processo de desenvolvimento, não sendo utilizados como modelos de estudo ou em testes pré-clínicos.

#### **4.3.1 Suínos como modelos para o estudo do câncer epitelial**

Em humanos, há três tipos de câncer epitelial: carcinoma basocelular (CBC), carcinoma espinocelular (CEC), e melanoma cutâneo (MC). Dentre os três, o CBC é o tipo mais comum, representando 70% dos cânceres do epitélio que acometem os humanos (DE GRUIJL; VAN KRANEN; MULLENDERS, 2001).

Devido a diferenças moleculares e no tipo de pele entre humanos e camundongos, ainda não foram desenvolvidos modelos animais adequados para o câncer epitelial. Além disso, camundongos não desenvolvem o CBC, tipo de câncer de pele mais comum em humanos (KUZMUK; SCHOOK, 2011). Visto isso, devido às similaridades existentes entre a pele de suínos e humanos - como espessura, deposição lipídica, bioquímica de carboidratos, propriedades biofísicas de lipídios,

organização do colágeno e fibras elásticas – os suínos têm sido amplamente estudados como modelo animal para o câncer epitelial (LUNNEY, 2007; KUZMUK; SCHOOK, 2011).

Recentemente, Basel et al (2012) desenvolveram um modelo suíno para o câncer epitelial utilizando a técnica de xenotransplante, mencionada anteriormente. Nesse estudo, células de melanoma humano (linhagem A375SM de melanoma amelanótico) e células de carcinoma pancreático humano (linhagem PANC-1) foram implantadas subcutaneamente em suínos imunologicamente comprometidos, sendo a capacidade de formação tumoral das células neoplásicas avaliadas ao longo do tempo. Como resultado, foi observado que os suínos imunodeficientes foram capazes de receber as células tumorais humanas – não sendo observada rejeição – e de desenvolver tumores sólidos, muito semelhantes aos tumores observados em humanos. Assim, este modelo se mostra como um modelo potencial para o estudo de cânceres epiteliais, bem como outros tipos de câncer, oferecendo um modelo animal promissor para o teste de novos fármacos e estratégias de tratamento.

#### **4.3.2 Suínos como modelos para o estudo de gliomas**

Gliomas são tumores cerebrais originados em células gliais, ou seja, células que protegem, nutrem e dão suporte aos neurônios, podendo ocorrer no encéfalo, na medula espinhal ou junto a nervos periféricos. O glioblastoma multiforme (GBM) consiste na forma de tumor cerebral maligno mais frequente em seres humanos, sendo alvo de estudos de uma série de pesquisadores (WEN; KESARI, 2008).

A falta de modelos biomédicos adequados, tanto para o estudo e melhor compreensão da doença, quanto para uso em testes pré-clínicos de fármacos e equipamentos médicos, somada a problemas éticos relacionados ao uso de primatas como modelos para esse tipo de estudos, traz a necessidade de desenvolvimento de um novo modelo animal mais adequado para o estudo de gliomas. Devido a semelhanças, principalmente com relação ao tamanho e anatomia, entre o cérebro

humano e de suínos, os suínos aparecem como uma alternativa potencial aos modelos biomédicos atuais para essas doenças (SELEK, et al., 2014).

Um estudo recente, realizado por Selek et al. (2014), avaliou a possibilidade de desenvolvimento de um suíno como modelo animal para o glioma humano através da implantação de duas linhagens celulares de glioblastoma multiforme humano (U87 MG e G4 U87 MG) no cérebro de suínos imunologicamente comprometidos. Como resultado, foi observado que os animais foram capazes de desenvolver tumores sólidos, muito semelhantes aos tumores cerebrais observados em humanos, em um período de aproximadamente 30 dias. Assim, esse estudo demonstrou o desenvolvimento do primeiro modelo biomédico para o estudo de gliomas utilizando uma espécie de grande porte - os suínos - como modelo, o qual apresenta grande potencial para uso em testes pré-clínicos de novas abordagens terapêuticas e equipamentos de uso médico, bem como para o estudo e melhor compreensão do desenvolvimento e progressão dos gliomas.

#### **4.3.3 Um modelo suíno inespecífico para o estudo do câncer humano**

Estudos acerca do desenvolvimento de suínos como modelo animal para o estudo do câncer humano também têm buscado a geração de um modelo que possa ser utilizado para o estudo de todo e qualquer tipo de câncer, não apenas para um câncer específico. Observando as similaridades genéticas e fisiológicas entre suínos e humanos e as limitações encontradas no uso dos modelos animais atuais, um grupo de pesquisadores do Laboratório de Genômica Comparativa da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign tem trabalhado no desenvolvimento de um suíno transgênico induzível para o câncer humano (RODRIGUES, 2013; RUND, 2013).

Para isso, foram utilizados fibroblastos fetais suínos geneticamente modificados portadores de dois genes mutados sabidamente relacionados ao desenvolvimento de câncer em humanos (Kras e p53) (ADAM, et al., 2007) como doadores para a técnica de TNCS, gerando, então, suínos transgênicos portadores das mutações acima



mencionadas. O modelo foi desenvolvido de forma condicional, através do uso do sistema Cre/LoxP, possibilitando a indução da expressão das formas mutantes dos genes Kras e p53 de forma tecido-específica e permitindo, assim, a indução da formação de tumores em qualquer região desejada no organismo do modelo suíno.

Resultados preliminares obtidos a partir de testes *in vitro* demonstraram que as células tumorais derivadas dos suínos transgênicos apresentam grande potencial tumorigênico. Além disso, testes *in vivo* demonstraram que essas células são capazes de formar tumores quando implantadas subcutaneamente em camundongos imunologicamente comprometidos (RODRIGUES, 2013; RUND, 2013).

Futuramente, testes *in vivo* em suínos serão realizados. Porém, a partir do dados já obtidos, pode-se observar que esta abordagem pode levar à geração de um modelo suíno para o câncer humano com grande potencial para o estudo e melhor compreensão da doença, bem como para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## 5 Considerações Finais

Perante o exposto, percebe-se que são inúmeros os esforços para a melhor compreensão dos aspectos envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de tumores, bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas eficientes, o que consiste em um processo difícil devido à complexidade da doença como um todo e das interações genéticas e ambientais envolvidas.

Os modelos animais são ferramentas essenciais para a melhor compreensão do câncer e para testes pré-clínicos de novas abordagens terapêuticas. Embora os modelos animais clássicos tenham sido de extrema importância para a obtenção do conhecimento atual acerca do câncer, pode-se perceber que tais modelos apresentam utilidade limitada devido à sua incapacidade de representar essa doença de forma acurada, demonstrando a necessidade de desenvolvimento de novos modelos animais mais similares aos humanos.

A obtenção da sequência completa do genoma suíno foi um fator chave para o desenvolvimento e aceitação desse animal como modelo biomédico. A alta similaridade entre os genomas suíno e humano, bem como outras similaridades já abordadas anteriormente (anatômicas e fisiológicas), juntamente ao desenvolvimento de técnicas de manipulação genética e clonagem, proporcionaram a possibilidade de utilização do suíno como um modelo animal relevante para o estudo do câncer humano.

Embora uma série de avanços já tenham sido obtidos - conforme demonstrado ao longo desta revisão - com relação ao uso dos suínos como modelos biomédicos

para o estudo do câncer humano, essa abordagem ainda consiste em uma ideia nova na comunidade científica. A utilização dos suínos como modelos para o câncer aparece como uma abordagem promissora para a melhor compreensão da doença e desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas mais eficazes. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias a fim de promover o uso dos suínos como alternativa aos modelos de câncer atuais.

## Referências

- ABBOTT, A. Biologists claim Nobel prize with a knock-out. **Nature**. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/2007/071009/full/449642a.html>> Acesso em: 27 jun 2014.
- ADAM, S. J.; RUND, L. A.; KUZMUK, K. N.; ZACHARY, J. F.; SCHOOK, L. B.; COUNTER. C. M. Genetic induction of tumorigenesis in Swine. **Oncogene**. v. 26, p. 1038-1045, 2007.
- AIGNER, B.; RENNER, S.; KESSLER, B.; KLYMIUK, N.; KUROME, M.; WÜNSCH, A.; WOLF, E. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. **J Mol Med (Berl)**. v. 88, n. 7, p. 653-664, 2010.
- AMP (Americans for Medical Progress). Disponível em: <<http://www.amprogress.org>> Acesso em: 17 jun 2014.
- ANDERSON, L. J.; JARRETT, W. F. H. Lymphosarcoma (leukemia) in cattle sheep and pigs in Great Britain. **Cancer**. v. 22, n. 2, p. 398-405, 1968.
- ARBEIT, J. M.; MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M.; HANAHAN, D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. **Am J Pathol**. v. 142, n. 4, p. 1187-1197, 1993.
- BARR, M. M. Super models. **Phys Genom**. v. 13, p. 15-24, 2003.

BASEL, M. T.; BALIVADA, S.; BECK, A. P.; KERRIGAN, M. A.; PYLE, M. M.; DEKKERS, J. C. M.; WYATT, C. R.; ROWLAND, R. R. R.; ANDERSON, D. E.; BOSSMAN, S. H.; TROYER, D. L. Human Xenografts Are Not Rejected in a Naturally Occurring Immunodeficient Porcine Line: A Human Tumor Model in Pigs. **BioResearch**. v. 1, n. 2, p. 63-68, 2012.

BAZIN, H. The Swine Erysipelas Vaccine: 1883. In: **Vaccination - A History: From Lady Montagu to Genetic Engineering**. Montrouge, França: John Libbey Eurotext Ltd. 2011.

BECHER, O. J.; HOLLAND, E. C. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. **Cancer Res**. v. 66, p. 3355–3358, 2006.

BRINSTER, R. L.; CHEN, H.Y.; TRUMBAUER, M.; SENEAR, A.W.; WARREN, R.; PALMITER, R.D. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. **Cell**. v. 27, p. 223-231, 1981.

BRINSTER, R. L.; CHEN, H. Y.; MESSING, A.; VAN DYKE, T.; LEVINE, A. J.; PALMITER, R. D. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. **Cell**. v. 37, n. 2, p. 367-379, 1984.

BROCK, T. D. Robert Koch: A Life in Medicine and Bacteriology. Washington, DC, EUA: **ASM Press**. 1999, 364 p.

BROWN, D. G.; JOHNSON, D. F. Diseases of aged swine. **J Am Vet Med Assoc**. v. 157, n. 11, p. 1914-1918, 1970.

BYNUM, W. F. Science and the Practice of Medicine in the Nineteenth Century. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**. 1994, 283 p.

CABOT, R. A.; KÜHHOLZER, B.; CHAN, A.W.; LAI, L.; PARK, K. W.; CHONG, K. Y.; SCHATTE, 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, n. 2, p. 205-214, 2001.

CAMPOS, V. F.; LEON, P. M. M.; COLLARES, T. Animais Transgênicos e Câncer. In: **Oncologia Celular e Molecular: inovações biotecnológicas**. Pelotas, RS: Editora da Universidade Federal de Pelotas. 2011, p. 269-286.

CAPECCHI, M. R. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. **Trends in Genetics**. v. 5, n. 3, p. 70-76, 1989.

CARLSON, D. F.; GEURTS, A. M.; GARBE, J. R.; PARK, C. W.; RANGEL-FILHO, A.; O'GRADY, S. M.; JACOB, H. J.; STEER, C. J.; LARGAESPADA, D. A.; FAHRENKRUG, S. C. Efficient mammalian germline transgenesis by cis enhanced Sleeping Beauty transposition. **Transgenic Res**. v. 20, 2011.

CARTER, D. B.; LAI, L.; PARK, K. W.; SAMUEL, M.; LATTIMER, J. C.; JORDAN, K. R.; ESTES, D. M.; BESCH-WILLIFORD, C.; PRATHER, R. S. Phenotyping of transgenic cloned piglets. **Cloning Stem Cells**. v. 4, n. 2, p. 131-145, 2002.

CLARKE, R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. **Breast Cancer Res Treat**. v. 39, n. 1, p. 69-86, 1996.

COOPER, D. K. C.; GOLLACKNER, B.; SACHS, D. H. Will the pig solve the transplantation backlog? **Annual Rev of Med**. v. 53, p. 133-147, 2002.

CONN, M. P. Sourcebook of Models for Biomedical Research. **Humana Press**. 2008, 794 p.

COURT, W. E. Pharmacy from the ancient world to 1100 AD. In: **Making Medicines: A Brief History of Pharmacy and Pharmaceuticals**. Ed. Stuart Anderson. Pharmaceutical Press, 2005, p. 21-36.

DAI, Y.; VAUGHT, T. D.; BOONE, J.; CHEN, S. H.; PHELPS, C. J.; BALL, S.; MONAHAN, J. A.; JOBST, P. M.; MCCREATH, K. J.; LAMBORN, A. E.; COWELL-LUCERO, J. L.; WELLS, K. D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I. A.; AYARES, D. L. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. **Nature Biotech**. v. 20, n. 3, p. 251-255, 2002.

DE GRUIJL, F. R.; VAN KRANEN, H. J.; MULLENDERS, L. H. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **J Photochem Photobiol B**. v. 63, n. 1-3, p. 19-27, 2001.

eMICE - NCI (electronic Models Information Communication, and Education - National Cancer Institute). Disponível em: <<http://emice.nci.nih.gov/>> Acesso em: 19 jun 2014.

DONEHOWER, L. A. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. **Semin Cancer Biol.** v. 7, n. 5, p. 269-278, 1996.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FERREIRA, A. B. H. Mini Aurélio – O Dicionário da Língua Portuguesa. 8 ed. **Positivo.** 2010, 856 p.

FBR (Foundation for Biomedical Research). Disponível em:  
<<http://www.fbresearch.org>> Acesso em: 16 jun 2014.

FRANCO, N. H. Animals Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. **Animals.** v. 3, p. 238-273, 2013.

FREESE, K. K.; TUVESON, D. A. Maximizing mouse cancer models. **Nature Reviews Cancer.** v. 7, p. 654-658, 2007.

GASZNER, M.; FELSENFELD, G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. **Nat Rev Genet.** v. 7, p. 703-713, 2006.

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.

GREGORY, A. Harvey's Heart: The Discovery of Blood Circulation. Cambridge, UK: **Icon Books.** 2001.

GROENEN, M. A. M.; ARCHIBALD, A. L.; UENISHI, H.; TUGGLE, C. K.; TAKEUCHI, Y.; ROTHSCHILD, M. F.; ROGEL-GAILLARD, C.; PARK, C.; MILAN, D.; MEGENS, H. J.; LI, S.; LARKIN, D. M.; KIM, H.; FRANTZ, L. A.; CACCAMO, M.; AHN, H.; AKEN, B. L.; ANSELMO, A.; ANTHON, C.; AUVIL, L.; BADAOU, B.; BEATTIE, C. W.; BENDIXEN, C.; BERMAN, D.; BLECHA, F.; BLOMBERG, J.; BOLUND, L.; BOSSE, M.; BOTTI, S.; BUJIE, Z.; BYSTROM, M.; CAPITANU, B.; CARVALHO-SILVA, D.; CHARDON, P.; CHEN, C.; CHENG, R.; CHOI, S. H.; CHOW, W.; CLARK, R. C.; CLEE, C.; CROOIJMANS, R. P.; DAWSON, H. D.; DEHAIS, P.; DE SAPIO, F.; DIBBITS, B.; DROU, N.; DU, Z. Q.; EVERSOLE, K.; FADISTA, J.; FAIRLEY, S.; FARAUT, T.; FAULKNER, G. J.; FOWLER, K. E.; FREDHOLM, M.; FRITZ, E.; GILBERT, J. G.;

GIUFFRA, E.; GORODKIN, J.; GRIFFIN, D. K.; HARROW, J. L.; HAYWARD, A.; HOWE, K.; HU, Z. L.; HUMPHRAY, S. J.; HUNT, T.; HORNSHØJ, H.; JEON, J. T.; JERN, P.; JONES, M.; JURKA, J.; KANAMORI, H.; KAPETANOVIC, R.; KIM, J.; KIM, J. H.; KIM, K. W.; KIM, T. H.; LARSON, G.; LEE, K.; LEE, K. T.; LEGGETT, R.; LEWIN, H. A.; LI, Y. U. W.; LOVELAND, J. E.; LU, Y.; LUNNEY, J. K.; MA, J.; MADSEN, O.; MANN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; MOROZUMI, T.; MURTAUGH, M. P.; NARAYAN, J.; NGUYEN, D. T.; NI, P.; OH, S. J.; ONTERU, S.; PANITZ, F.; PARK, E. W.; PARK, H. S.; PASCAL, G.; PAUDEL, Y.; PEREZ-ENCISO, M.; RAMIREZ-GONZALEZ, R.; REECY, J. M.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ROHRER, G. A.; RUND, L.; SANG, Y.; SCHACHTSCHNEIDER, K.; SCHRAIBER, J. G.; SCHWARTZ, J.; SCOBIE, L.; SCOTT, C.; SEARLE, S.; SERVIN, B.; SOUTHEY, B. R.; SPERBER, G.; STADLER, P.; SWEEDLER, J. V.; TAFER, H.; THOMSEN, B.; WALI, R.; WANG, J.; WANG, J.; WHITE, S.; XU, X.; YERLE, M.; ZHANG, G.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, S.; ROGERS, J.; CHURCHER, C.; SCHOOK, L. B. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. **Nature**. v. 491, n. 7424, p. 393-398, 2012.

GUERRINI, A. *Experimenting with Humans and Animals: From Gallen to Animal Rights* (Johns Hopkins Introductory Studies in the History of Science). **Johns Hopkins University Press**. 2003, 184 p.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E. JR.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**. v. 315, n. 6021, p. 20-26, 1985.

HAU, J. *Animal Models for Human Disease: An Overview*. In: *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. **Humana Press**. 2008, p. 3-8.

HAU, J.; VANHOOSIER, G.L. *Handbook of Laboratory Animal Science*. 3 ed. **CRC Press**, 2010.

HANAHAN, D.; WAGNER, E. F.; PALMITER, R. D. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. **Genes Dev**. v. 21, n. 18, p. 2258-2270, 2007.

HEINRITZ, S. N.; MOSENTHIN, R.; WEISS, E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. **Nutr Res Rev**. v. 26, n. 2, p. 191-209, 2013.



HOFMANN, A.; KESSLER, B.; EWERLING, S.; WEPPERT, M.; VOGG, B.; LUDWIG, H.; STOJKOVIC, M.; BOELHAUVE, M.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. **EMBO Rep.** v. 4, n. 11, p. 1054-1060, 2003.

HUMPHRAY, S. J.; SCOTT, C. E.; CLARK, R.; MARRON, B.; BENDER, C.; CAMM, N.; DAVIS, J.; JENKS, A.; NOON, A.; PATEL, M.; SEHRA, H.; YANG, F.; ROGATCHEVA, M. B.; MILAN, D.; CHARDON, P.; ROHRER, G.; NONNEMAN, D.; DE JONG, P.; MEYERS, S. N.; ARCHIBALD, A.; BEEVER, J. E.; SCHOOK, L. B.; ROGERS, J. A high utility integrated map of the pig genome. **Genome Biol.** v. 8, n. 7, 2007.

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. **Biol Reprod.** v. 69, n. 3, p. 1060-1068, 2003.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>> Acesso em: 25 jun 2014.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>> Acesso em: 17 jun 2014.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2014 – Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**. 2014, 124 p. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf)> Acesso em: 25 jun 2014.

JAKOBSEN, J. E.; LI, J.; KRAGH, P. M.; MOLDT, B.; LIN, L.; LIU, Y.; SCHMIDT, M.; WINTHER, K. D.; SCHYTH, B. D.; HOLM, I. E.; VAJTA, G.; BOLUND, L.; CALLESEN, H.; JØRGENSEN, A. L.; NIELSEN, A. L.; MIKKELSEN, J. G. Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. **Transgenic Res.** v. 20, p. 533–535, 2011.

JENSEN, T. W.; MAZUR, M. J.; PETTIGEW, J. E.; PEREZ-MENDOZA, V. G.; ZACHARY, J.; SCHOOK, L. B. A cloned pig model for examining atherosclerosis induced by high fat, high cholesterol diets. **Animal Biotechnology.** v. 21, n. 3, p. 179-187, 2010.

JOHNSON, L.; MERCER, K.; GREENBAUM, D.; BRONSON, R. T.; CROWLEY, D.; TUVESON, D. A.; JACKS, T. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. **Nature**. v. 410, n. 6832, p. 1111-1116, 2001.

KANDALL, S. D.; LINARDIC, C. M.; ADAM, S. J.; COUNTER, C. M. A network of genetic events sufficient to convert normal human cells to a tumorigenic state. **Cancer Res**. v. 65, n. 21, p. 9824-9828, 2005.

KIM, I. K.; BAEK, S. H. Mouse models for breast cancer metastasis. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 394, n. 3, p. 443-447, 2010.

KIMLIN, L. C.; CASAGRANDE, G.; VIRADOR, V. M. In Vitro Three Dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update. **Molecular Carcinogenesis**. v. 52, p.167-182, 2013.

KRAGH, P. M.; NIELSEN, A. L.; LI, J.; DU, Y.; LIN, L.; SCHMIDT, M.; BOGH, I. B.; HOLM, I. E.; JAKOBSEN, J. E.; JOHANSEN, M. G.; PURUP, S.; BOLUND, L.; VAJTA, G.; JORGENSEN, A. L. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. **Transgenic Res**. v. 18, n. 4, p. 545-558, 2009.

KUZMUK, K. N.; SCHOOK, L. B. Pig as a Model for Biomedical Sciences. In: **Genetics of the Pig**. 2 ed. ©CAB International, 2011. p. 426-444.

LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PARK, K. W.; CHEONG, H. T.; GREENSTEIN, J. L.; IM, G. S.; SAMUEL, M.; BONK, A.; RIEKE, A.; DAY, B. N.; MURPHY, C. N.; CARTER, D. B.; HAWLEY, R. J.; PRATHER, R. S. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. **Science**. v. 285, n. 5557, p. 1089-1092, 2002.

LASKE, T.; SKADSBERG, N.; IAIZZO, P. A novel ex vivo heart model for the assessment of cardiac pacing systems. **Journal of Biomechanical Engineering**. v. 127, p. 894-898, 2005.

LAVITRANO, M.; BUSNELLI, M.; CERRITO, M. G.; GIOVANNONI, R.; MANZINI, S.; VARGIOLU, A. Sperm-mediated gene transfer. **Reprod Fertil Dev**. v. 18, n. 1-2, p. 19-23, 2006.

LI, D.; REN, B. H.; SHEN, Y.; WU, H.; WANG, C.; ZHANG, L.; ZHU, J.; JING, H. A Swine model for long-term evaluation of prosthetic heart valves. **ANZ J Surg.** v. 77, n. 8, p. 654-658, 2007.

LUNNEY, J. K. Advances in Swine Biomedical Genomics. **International Journal of Biological Sciences.** v. 3, n. 3, p. 179-184, 2007.

MAEHLE, A. H. Drugs on Trial: Experimental Pharmacology and Therapeutic Innovation in the Eighteenth Century. Amsterdam, Holanda: **Rodopi.** 1999, 380 p.

MAEHLE, A. H.; TROEHLER, U. Animal experimentation from antiquity to the end of the eighteenth century: Attitudes and arguments. In: **Vivisection in Historical Perspective.** Ed. Rupke, N.A. Croom Helm, 1987, p. 14-47.

MCMULLEN, E T. Anatomy of a physiological discovery: William Harvey and the circulation of the blood. **J. Roy. Soc. Med.** v. 88, p. 491–498, 1995.

MUSHEGIAN, A. R. **Foundations of Comparative Genomics.** 1 ed. Academic Press, 2007. 280 p.

NAGY, A. Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. **Genesis.** v. 26, n. 2, p. 99-109, 2000.

NORMANDIN, S. Claude Bernard and an introduction to the study of experimental medicine: “Physical vitalism”, dialectic, and epistemology. **J. Hist. Med. Allied Sci.** v. 62, p. 495-528, 2007.

NRC (National Research Council). Biomedical Models and Resources: Current Needs and Future Opportunities. Washington, D.C, EUA: **National Academy Press,** 1998. Disponível em: <[http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=6066&page=R1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=6066&page=R1)> Acesso em: 19 jun 2014.

O'MALLEY, C. D. Andreas Vesalius of Brussels. **University of California Press.** p. 1514-1564, 1964.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Disponível em: <http://www.who.int/en/> Acesso em: 25 jun 2014.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Rev. Inst Adolf Lutz**. v. 69, n. 4, p. 439-445, 2010.

PANTELOURIS, E. M. Absence of Thymus in a Mouse Mutant. **Nature**. v. 217, p. 370-371, 1968.

PARK, K. W.; CHEONG, H. T.; LAI, L.; IM, G. S.; KÜHHOLZER, B.; BONK, A.; SAMUEL, M.; RIEKE, A.; DAY, B. N.; MURPHY, C. N.; CARTER, D. B.; PRATHER, R. S. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. **Animal Biotechnology**. v. 12, n. 2, p. 173-181, 2001.

PINO, S.; BREHM, M. A.; COVASSIN-BARBERIS, L.; KING, M.; GOTT, B.; CHASE, T. H.; WAGNER, J.; BURZENSKI, L.; FOREMAN, O.; GREINER, D. L.; SHULTZ, L. D. Development of novel major histocompatibility complex class I and class II-deficient NOD-SCID IL2R gamma chain knockout mice for modeling human xenogeneic graft-versus-host disease. **Methods Mol Biol**. v. 602, p. 105-117, 2010.

POLLOCK, C. B.; ROGATCHEVA, M. B.; SCHOOK, L. B. Comparative genomics of xenobiotics metabolism: a porcine-human PXR gene comparison. **Mamm Genome**. v. 18, n. 3, p. 210-219, 2007.

PRATHER, R. S.; SHEN, M.; DAI, Y. Genetically modified pigs for medicine and agriculture. **Biotechnol Genet Eng Rev**. v. 25, p. 245-265, 2008.

QIU, H.; XIA, T.; CHEN, X.; ZHAO, X.; GAN, L.; FENG, S.; LEI, T.; YANG, Z. Cloning comparative characterization of porcine SCAP gene, and identification of its two splice variants. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 276, p. 187-196, 2006.

RDS (Research Defence Society RDS). Medical Advances and Animal Research – The Contribution of Animal Science to the Medical Revolution: Some Case Histories. London, UK: **RDS: Coalition for Medical Progress**, 2007. Disponível em: <<http://www.understandinganimalresearch.org.uk/assets/document/AC26356B-07C5-F3D6-E8647E6CAF55BFDF/medical-advances-and.pdf>> Acesso em: 16 jun 2014.

REMY, S.; TESSON, L.; MÉNORET, S.; USAL, C.; SCHARENBERG, A. M.; ANEGON, I. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. **Transgenic Res.** v. 19, p. 363–371, 2010.

RENNER, S.; FEHLINGS, C.; HERBACH, N.; HOFMANN, A.; VON WALDTHAUSEN, D. C.; KESSLER, B.; ULRICHS, K.; CHODNEVSKAJA, I.; MOSKALENKO, V.; AMSELGRUBER, W.; GÖKE, B.; PFEIFER, A.; WANKE, R.; WOLF, E. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. **Diabetes.** v. 59, n. 5, p. 1228-1238, 2010.

RODRIGUES, F. M; HU, W.; RUND, L.; LIANG, Y.; COUNTER, C.; SCHOOK, L. An inducible transgenic porcine model for human cancer. In: American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013, Washington D. C., EUA. **Anais eletrônicos.** Washington, D. C., EUA., 2013. Disponível em: <  
<http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=657bfb2c-d3eb-437c-a44b-1bd161de4e10&cKey=86db349e-bf4a-4647-b4a6-3f09186d00e7&mKey=%7b9B2D28E7-24A0-466F-A3C9-07C21F6E9BC9%7d>> Acesso em: 25 jun 2014.

ROE, S. A. Matter, Life, and Generation: Eighteenth-Century Embryology and the Haller-Wolff Debate. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**, 1981, 214 p.

ROGERS, C. S.; HAO, Y.; ROKHLINA, T.; SAMUEL, M.; STOLTZ, D. A.; LI, Y.; PETROFF, E.; VERMEER, D. W.; KABEL, A. C.; YAN, Z.; SPATE, L.; WAX, D.; MURPHY, C. N.; RIEKE, A.; WHITWORTH, K.; LINVILLE, M. L.; KORTE, S. W.; ENGELHARDT, J. F.; WELSH, M. J.; PRATHER, R. S. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. **J Clin Invest.** v. 118, n. 4, p. 1571-1577, 2008.

ROGERS, C. S.; ABRAHAM, W. M.; BROGDEN, K. A.; ENGELHARDT, J. F.; FISHER, J. T.; MCCRAY, P. B. JR.; MCLENNAN, G.; MEYERHOLZ, D. K.; NAMATI, E.; OSTEDGAARD, L. S.; PRATHER, R. S.; SABATER, JR.; STOLTZ, D. A.; ZABNER, J.; WELSH, M. J. The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 295, n. 2, p. 240-263, 2008.

RUBIO-VIQUEIRA, B.; JIMENO, A.; CUSATIS, G.; ZHANG, X.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; KARIKARI, C.; SHI, C.; DANENBERG, K.; DANENBERG, P. V.; KURAMOCHI, H.; TANAKA, K.; SINGH, S.; SALIMI-MOOSAVI, H.; BOURAOUD, N.; AMADOR, M. L.; ALTIOK, S.; KULESZA, P.; YEO, C.; MESSERSMITH, W.; ESHLEMAN, J.; HRUBAN, R. H.; MAITRA, A.; HIDALGO, M. An In vivo Platform for Translational Drug Development in Pancreatic Cancer. **Clin Cancer Res.** v. 12, p. 4652-4661, 2006.

RUND, L. A.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; HU, W.; RODRIGUES, F. M.; LIANG, Y.; SINGH, K.; COUNTER, C. M.; SCHOOK, L. B. Development of an Inducible Transgenic Onco-Pig Model. In: First International SEBM Conference, Shanghai, China, 2013.  
Disponível em:  
<[http://www.dbs.illinois.edu/comparativegenomics/articles\\_abstracts\\_view.aspx?ID=203](http://www.dbs.illinois.edu/comparativegenomics/articles_abstracts_view.aspx?ID=203)  
> Acesso em: 26 jun 2014.

SANDERS, S. W. Selection of Animal Models. 2012. Disponível em:  
<<http://uac.arizona.edu/vsc443/animalmodels/Selection%20of%20Animal%20Models%2012.pdf>> Acesso em: 15 jun 2014.

SCHMIDT, C.; WIEDMANN, F.; TRISTRAM, F.; ANAND, P.; WENZEL, W.; LUGENBIEL, P.; SCHWEIZER, P. A.; KATUS, H. A.; THOMAS, D. Cardiac expression and atrial fibrillation-associated remodeling of  $K_{v}p2.1$  (TREK-1)  $K^{+}$  channels in a porcine model. **Life Sci.** v. 97, n. 2, p. 107-115, 2013.

SCHOOK, L. B.; BEATTIE, C.; BEEVER, J.; DONOVAN, S.; JAMISON, R.; ZUCKERMANN, F.; NIEMI, S.; ROTHSCHILD, M.; RUTHERFORD, M.; SMITH, D. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. **Animal Biotechnology.** v. 16, n. 2, p. 183-190, 2005 (a).

SCHOOK, L. B.; BEEVER, J. E.; ROGERS, J.; HUMPHRAY, S.; ARCHIBALD, A.; CHARDON, P.; MILAN, D.; ROHRER, G.; EVERSOLE, K. Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. **Comparative and Functional Genomics.** v. 6, p. 252-255, 2005 (b)

SELEK, L.; SEIGNEURET, E.; NUGUE, G.; WION, D.; NISSOU, M. F.; SALON, C.; SEURIN, M. J.; CAROZZO, C.; PONCE, F.; ROGER, T.; BERGER, F. Imaging and histological characterization of a human brain xenograft in pig: The first induced glioma model in a large animal. **Journal of Neuroscience Methods.** v. 221, p. 159-165, 2014.

SIMMONS, D. The Use of Animal Models in Studying Genetic Disease: Transgenesis and Induced Mutation. **Nature Education**. v. 1, n. 1, p. 70, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-use-of-animal-models-in-studying-855>> Acesso em: 21 jun 2014.

SOUCEK, P.; GUT, I. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. **Xenobiotics**. v. 22, n. 1, p. 83-103, 1992.

STEWART, S. A.; WEINBERG, R. A. Telomerase and human tumorigenesis. **Semin Cancer Biol.** v. 10, n. 6, p. 399-406, 2000.

STEWART, T. A.; PATTENGALE, P. K.; LEDER, P. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. **Cell**. v. 38, p.627-637, 1984.

SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. Historical Foundations. In: **The Laboratory Rat**. Amsterdam, Holanda: Academic Press. 2006, p. 1-52.

SWANSON, K. S.; MAZUR, M. J.; VASHISHT, K.; RUND, L. A.; BEEVER, J. E.; COUNTER, C. M.; SCHOOK, L. B. Genomics and Clinical Medicine: Rationale for Creating and Effectively Evaluating Animal Models. **Exp Biol Med**. v. 229, n. 9, p. 866-875, 2004.

THEODOROU, V.; KIMM, M. A.; BOER, M.; WESSELS, L.; THEELEN, W.; JONKERS, J.; HILKENS, J. MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. **Nature Genet**. v. 39, p. 759–769, 2007.

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

TUMBLESON, M. E.; SCHOOK, L. B. Advances in Swine in Biomedical Research. **Springer**. 1997, 422 p.

ULLMANN, A. Pasteur-Koch: Distinctive ways of thinking about infectious diseases. **Microbe**. v. 2, p. 393-387, 2007.

UMEYAMA, K.; WATANABE, M.; SAITO, H.; KUROME, M.; TOHI, S.; MATSUNARI, H.; MIKI, K.; NAGASHIMA, H. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic cloned pigs. **Transgenic Res.** v. 18, p. 697–706, 2009.

VAN MUIJEN, G. N.; JANSEN, K. F.; CORNELISSEN, I. M.; SMEETS, D. F.; BECK, J. L.; RUITER, D. J. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. **Int J Cancer.** v. 48, n. 1, p. 85-91, 1991.

VIANA, C. J. M. **Aspectos de genômica comparativa.** 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

VIDEIRA, R. S.; DEBONI, M. C. Z.; ARAÚJO, C. A. S.; OKAMOTO, A. C.; MELHADO, R. M. Oncogenes e desenvolvimento do cancer. **Arq Ciênc Saúde Unipar.** v. 6, n. 1, p. 71-76, 2002.

VON STADEN, H. Herophilus: The Art of Medicine in Early Alexandria. **Cambridge University**, Cambridge, UK, 1989.

WALTERS, E. M.; WOLF, E.; WHYTE, J. J.; MAO, J.; RENNER, S.; NAGASHIMA, H.; KOBAYASHI, E.; ZHAO, J.; WELLS, K. D.; CRITSER, J. K.; RILEY, L. K.; PRATHER, R. S. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. **BMC Medical Genomics.** v. 5, n. 55, 2012.

WATERS, D. J.; SAKR, W. A.; HAYDEN, D. W.; LANG, C. M.; MCKINNEY, L.; MURPHY, G. P.; RADINSKY, R.; RAMONER, R.; RICHARDSON, R. C.; TINDALL, D. J. Workgroup 4: Spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. **The Prostate.** v. 36, n. 1, p. 64-67, 1998.

WATERSTON, R. H.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; ABRIL, J. F.; AGARWAL, P.; AGARWALA, R.; AINSCOUGH, R.; ALEXANDERSSON, M.; AN, P.; ANTONARAKIS, S. E.; ATTWOOD, J.; BAERTSCH, R.; BAILEY, J.; BARLOW, K.; BECK, S.; BERRY, E.; BIRREN, B.; BLOOM, T.; BORK, P.; BOTCHERBY, M.; BRAY, N.; BRENT, M. R.; BROWN, D. G.; BROWN, S. D.; BULT, C.; BURTON, J.; BUTLER, J.; CAMPBELL, R. D.; CARNINCI, P.; CAWLEY, S.; CHIAROMONTE, F.; CHINWALLA, A. T.; CHURCH, D. M.; CLAMP, M.; CLEE, C.; COLLINS, F. S.; COOK, L. L.; COPLEY, R. R.; COULSON, A.; COURONNE, O.; CUFF, J.; CURWEN, V.; CUTTS, T.; DALY, M.; DAVID, R.; DAVIES, J.; DELEHAUNTY, K. D.; DERI, J.; DERMITZAKIS, E. T.; DEWEY, C.; DICKENS, N. J.; DIEKHANS, M.; DODGE, S.; DUBCHAK, I.; DUNN, D. M.; EDDY, S. R.; ELNITSKI, L.; EMES, R. D.; ESWARA, P.; EYRAS, E.; FELSENFELD, A.;



FEWELL, G. A.; FLICEK, P.; FOLEY, K.; FRANKEL, W. N.; FULTON, L. A.; FULTON, R. S.; FUREY, T. S.; GAGE, D.; GIBBS, R. A.; GLUSMAN, G.; GNERRE, S.; GOLDMAN, N.; GOODSTADT, L.; GRAFHAM, D.; GRAVES, T. A.; GREEN, E. D.; GREGORY, S.; GUIGÓ, R.; GUYER, M.; HARDISON, R. C.; HAUSSLER, D.; HAYASHIZAKI, Y.; HILLIER, L. W.; HINRICHS, A.; HLAVINA, W.; HOLZER, T.; HSU, F.; HUA, A.; HUBBARD, T.; HUNT, A.; JACKSON, I.; JAFFE, D. B.; JOHNSON, L. S.; JONES, M.; JONES, T. A.; JOY, A.; KAMAL, M.; KARLSSON, E. K.; KAROLCHIK, D.; KASPRZYK, A.; KAWAI, J.; KEIBLER, E.; KELLS, C.; KENT, W. J.; KIRBY, A.; KOLBE, D. L.; KORF, I.; KUCHERLAPATI, R. S.; KULBOKAS, E. J.; KULP, D.; LANDERS, T.; LEGER, J. P.; LEONARD, S.; LETUNIC, I.; LEVINE, R.; LI, J.; LI, M.; LLOYD, C.; LUCAS, S.; MA, B.; MAGLOTT, D. R.; MARDIS, E. R.; MATTHEWS, L.; MAUCELI, E.; MAYER, J. H.; MCCARTHY, M.; MCCOMBIE, W. R.; MCLAREN, S.; MCLAY, K.; MCPHERSON, J. D.; MELDRIM, J.; MEREDITH, B.; MESIROV, J. P.; MILLER, W.; MINER, T. L.; MONGIN, E.; MONTGOMERY, K. T.; MORGAN, M.; MOTT, R.; MULLIKIN, J. C.; MUZNY, D. M.; NASH, W. E.; NELSON, J. O.; NHAN, M. N.; NICOL, R.; NING, Z.; NUSBAUM, C.; O'CONNOR, M. J.; OKAZAKI, Y.; OLIVER, K.; OVERTON-LARTY, E.; PACHTER, L.; PARRA, G.; PEPIN, K. H.; PETERSON, J.; PEVZNER, P.; PLUMB, R.; POHL, C. S.; POLIAKOV, A.; PONCE, T. C.; PONTING, C. P.; POTTER, S.; QUAIL, M.; REYMOND, A.; ROE, B. A.; ROSKIN, K. M.; RUBIN, E. M.; RUST, A. G.; SANTOS, R.; SAPOJNIKOV, V.; SCHULTZ, B.; SCHULTZ, J.; SCHWARTZ, M. S.; SCHWARTZ, S.; SCOTT, C.; SEAMAN, S.; SEARLE, S.; SHARPE, T.; SHERIDAN, A.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; SINGER, J. B.; SLATER, G.; SMIT, A.; SMITH, D. R.; SPENCER, B.; STABENAU, A.; STANGE-THOMANN, N.; SUGNET, C.; SUYAMA, M.; TESLER, G.; THOMPSON, J.; TORRENTS, D.; TREVASKIS, E.; TROMP, J.; UCLA, C.; URETA-VIDAL, A.; VINSON, J. P.; VON NIEDERHAUSERN, A. C.; WADE, C. M.; WALL, M.; WEBER, R. J.; WEISS, R. B.; WENDL, M. C.; WEST, A. P.; WETTERSTRAND, K.; WHEELER, R.; WHELAN, S.; WIERZBOWSKI, J.; WILLEY, D.; WILLIAMS, S.; WILSON, R. K.; WINTER, E.; WORLEY, K. C.; WYMAN, D.; YANG, S.; YANG, S. P.; ZDOBNOV, E. M.; ZODY, M. C.; LANDER, E. S. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**. v. 420, n. 6915, p. 520-562, 2002

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. **Nature**. 1953.

WEINBERG, R. A. A Biologia do Câncer. **Artmed**. 1 ed. 2008, 864 p.

WELSH, M. J.; ROGERS, C. S.; STOLTZ, D. A.; MEYERHOLZ, D. K.; PRATHER, R. S. Development of a porcine model of cystic fibrosis. **Trans Am Clin Climatol Assoc**. v. 120, p. 149-162, 2009.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N Engl J Med**. v. 359, p. 492–507, 2008.

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 Lett.** v. 571, n. 1-3, p. 233-236, 2004.

WHYTE, J. J.; ZHAO, J.; WELLS, K. D.; SAMUEL, M. S.; WHITWORTH, K. M.; WALTERS, E. M.; LAUGHLIN, M. H.; PRATHER, R. S. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. **Mol Reprod Dev.** v. 78, n. 2, 2011.

WHYTE, J. J.; PRATHER, R. S. Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. **Mol Reprod Dev.** v. 78, n. 10-11, p. 879-891, 2011.

YAMAGIWA, K.; ICHIKAWA, K. Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma. **J Cancer Res.** v. 3, p. 1-29, 1918.