

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA ENTRE CABRA (*Capra hircus*) CANINDÉ TRANSGÊNICA PARA EXPRESSÃO DO FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS HUMANOS (hG-CSF) NA GLÂNDULA MAMÁRIA E CABRA NÃO TRANSGÊNICA

Ricardo Wandson Alves Pereira Junior

Iniciante Científico | Discente – Centro Universitário Fametro - Unifametro

ricardo.junior01@aluno.unifametro.edu.br

Glauco Jonas Lemos Santos

Docente – Centro Universitário Fametro - Unifametro

glauco.santos@professor.unifametro.edu.br

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária

Encontro Científico: IX Encontro de Monitoria e Iniciação Científica

RESUMO

A transgênese animal já é uma realidade para a ciência e tem ganhado cada vez mais espaço ao longo do tempo. A escolha de um biorreator adequado para a expressão de proteínas recombinantes humanas torna-se necessária tendo em vista atender a demanda do mercado em escalas industriais. Contudo, a preocupação com esses animais transgênicos anda aliada com o avanço da tecnologia, uma vez que ainda não é totalmente elucidada as consequências da transgênese para o indivíduo acometido. Dessa forma, torna-se necessário o monitoramento periódico dos diversos parâmetros fisiológicos e comportamentais de animais transgênicos. Portanto, o presente trabalho busca através de uma análise comparativa de exames laboratoriais, estudar a variabilidade fisiológica entre uma cabra transgênica para Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos Humanos (hG-CSF) e cabra não transgênica. Para tanto, foram realizados exames de hemograma e dosagens bioquímicas de função hepática e renal, uma vez que ainda não há pleno consenso científico a respeito da influência que a transgenia acarreta aos parâmetros hematológicos. Conclui-se que ainda se faz necessário maiores investimentos para a produção de proteínas humanas com origem de animais transgênicos.

Palavras-chave: Transgênese em caprinos; Patologia Clínica de caprinos; hG-CSF.

INTRODUÇÃO



A transgênese animal teve início na década de 70, a partir do advento da tecnologia de DNA recombinante. Posteriormente nos anos 80, a primeira produção de proteína se deu com a insulina humana recombinante por meio da utilização de animais transgênicos. Sendo assim, a indústria farmacêutica e pesquisadores investiram o máximo de tempo e dinheiro possível nas mais diversas produções de proteínas recombinantes. Contudo, ainda existiam limitações relevantes a serem superadas, a fim de que as proteínas recombinantes pudessem atingir uma produção industrial satisfatória que atendesse ao mercado comercial. Os primeiros métodos utilizados para obtenção de proteínas recombinantes tinham como desvantagem a baixa produção, uma vez que algumas proteínas eram sintetizadas em pouca quantidade (TEIXEIRA, V. J. F. F., *et al.*, 2014). Nos anos 90, a partir de testes realizados com camundongos, descobriu-se que mamíferos poderiam ser utilizados como biorreatores, mormente que a expressão da proteína recombinante acontece na glândula mamária. Desde então, mamíferos transgênicos como ovelhas, cabras, vacas e coelhos vêm sendo utilizados largamente, objetivando-se atender a demanda industrial de produção, bem como avanços farmacológicos nas condições clínicas de pacientes humanos (BATISTA, R. I. T. P., 2014).

Com a evolução do estudo, propôs-se que a escolha do animal como biorreator seria um dos principais aspectos para a obtenção de quantidades consideráveis de proteína, buscando-se unir qualidades fenotípicas e genotípicas, a saber: boas taxas de reprodução e volumes satisfatórios de leite produzido (TEIXEIRA, V. J. F. F., *et al.*, 2006). Tendo em mente aliar uma espécie animal às características desejáveis para produção de proteínas recombinantes, foi instituído a utilização de caprinos (*Capra hircus*) para a técnica. Segundo Freitas. (2014), a utilização da espécie representa um excelente modelo para a transgênese, posto que a produção de animais fundadores, bem como os custos operacionais, é mais baixa e fácil de administrar em comparação a outras espécies, como os bovinos (TEIXEIRA, V. J. F. F., *et al.*, 2014).

Em 2012, o Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução da Universidade Estadual do Ceará (LFRC/ UECE) propôs a produção de caprinos transgênicos com capacidade de transmitir a linhagem transgênese para seus descendentes, a fim de sanar a demanda comercial.

A fim de dar a devida importância para os exames laboratoriais realizados por Batista (2014), e objetivando-se a comparação dos resultados entre uma cabra (*Capra hircus*) da raça Canindé, F1, transgênica para hG-CSF em relação a outra cabra da raça Canindé não transgênica, foram realizados hemograma dos animais. Adicionalmente, foram incluídos exames bioquímicos de função hepática e renal.

METODOLOGIA

O presente estudo consistiu na amostragem de dados qualitativos e quantitativos visando análise comparativa de exames laboratoriais, a saber: Contagem de hemácias, Contagem de leucócitos totais, Contagem diferencial de leucócitos, Hematócrito, Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase alcalina (ALP), Ureia e Creatinina, entre duas Cabras (*Capra hircus*) submetidas ao mesmo manejo. Um dos indivíduos, da raça Canindé e nascida em 2011, é considerada a primeira cabra F1 transgênica no Brasil para uma proteína de Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humanos (hG-CSF) na glândula mamária. O outro é uma cabra não transgênica nascida em 2016.

Os animais encontravam-se alojados no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFRC) na Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza.

As coletas de sangue foram realizadas por meio de punção venosa (veia jugular), pelo mesmo técnico, em dois dias distintos, com intervalo de sete dias entre cada coleta, no mesmo horário (9:00 am), utilizando-se um coletor e agulha a vácuo, bem como os tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, e outro sem anticoagulante.

Seguidamente à coleta, os tubos de cada animal foram identificados: Cabra transgênica R64F e a não transgênica 89. Os tubos foram acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável e imediatamente transportados para o Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Medicina Veterinária da Unifametro (CEMEVET), onde as amostras foram processadas e os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados.

Para a Contagem total de hemácias, as amostras previamente homogeneizadas por 5min foram diluídas na ordem de 4ml de solução salina (NaCl 0,9%) para 20 μ L de sangue. Em seguida, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer sob o aumento de 400x em microscópio. A contagem foi realizada em cinco campos centrais da câmara e o somatório foi multiplicado por 10.000, de acordo com a metodologia de contagem manual usual.

Os valores da Contagem de leucócitos totais foram obtidos por meio da diluição em tubo Eppendorf® de 20 μ L de sangue previamente homogeneizado em 400 μ L de líquido de Turk, sendo também submetida a contagem em câmara de Neubauer sob aumento de 400x em microscópio nos quatro campos laterais da câmara. O somatório foi multiplicado por 50, de acordo com a metodologia de contagem manual usual.

A Contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo em lâmina fixado e corado por Panótico simples. Posteriormente, a lâmina foi avaliada em

microscópio (aumento de 400x) e procedeu-se a contagem de 100 leucócitos, diferenciando-os em Neutrófilos, Linfócitos, Eosinófilos e Monócitos e obtendo com isso os valores leucocitários absolutos e relativos.

Para obtenção do hematócrito, tubos capilares preenchidos com sangue com anticoagulante (EDTA) foram centrifugados (11.000 rpm/ 5 min). Na sequência, procedeu-se a leitura do capilar com auxílio de régua leitora de microhematócrito.

Os valores dos exames bioquímicos foram obtidos após a centrifugação do sangue sem anticoagulante (3.000 rpm/ 5 min), separando-se dessa forma o soro do sangue. Em seguida, foram empregados kits comerciais (ALT/TGP, Creatinina, Fosfatase Alcalina, Uréia UV; Biofocvet®) submetidos à Analisador Semi Automático (Mindray BA 88A®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise hematológica é uma das áreas da Patologia Clínica que segundo Silva, M. N. (2016) serve para auxiliar no diagnóstico, prognóstico, tratamento e melhor entendimento do estado de saúde do animal.

Caprinos não estão entre as principais espécies para a realização de exames laboratoriais de Patologia Clínica (WEISS, D. J. & WARDROP, J. 2010). Ainda assim, existem valores de referência para eritrograma e leucograma, mesmo que os resultados obtidos possam variar amplamente de acordo com a região e modo de criação (WEISS, D. J. & WARDROP, J. 2010). Os valores de referência para a espécie podem ser encontrados nas Tabelas 1 e 2 bem como os valores obtidos no estudo nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 1 – Valores de referência do Eritrograma e Leucograma para caprinos não transgênicos.

| ERITROGRAMA | | |
|---|---------------------|-------|
| PARAMÊTRO | FAIXA DE REFERÊNCIA | MÉDIA |
| Eritrócitos ($\times 10^6$ μL) | 8.0 – 18.0 | 13 |
| Hemoglobina | 8.0 – 12.0 | 28 |
| MCV (fL) | 16 – 25 | 19.5 |
| MCH (%) | 30 – 36 | 33 |
| RBC diâmetro (μm) | 2.5 – 3.9 | 3.2 |
| LEUCOGRAMA | | |
| Leucócitos totais ($/\mu\text{L}$) | 4.000 – 1.300 | 9.000 |
| Neutrófilos bastonetes | | Raro |



| | | |
|-------------------------|---------------|-------|
| Neutrófilos segmentados | 1.000 – 7.200 | 3.200 |
| Linfócitos | 2.000 – 9.000 | 5.000 |
| Monócito | 0 – 550 | 450 |
| Eosinófilo | 50 – 650 | 450 |
| Basófilo | 0 – 120 | 50 |

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL

| | | |
|-------------------------|---------|------|
| Neutrófilos bastonetes | | Raro |
| Neutrófilos segmentados | 30 – 48 | 36.0 |
| Linfócitos | 50 – 70 | 56.0 |
| Monócito | 0 – 4 | 2.5 |
| Eosinófilo | 1 – 8 | 5.0 |
| Basófilo | 0 – 1 | 0.5 |
| Monócito | 0 – 550 | 450 |
| Eosinófilo | 1 – 8 | 5.0 |
| Basófilo | 0 – 1 | 0.5 |

Fonte: Weiss, J. D. & Wardrop J. K. Schalm's Veterinary Hematology 6^{ed}

Tabela 2 – Valores de Leucograma de Cabra F1 transgênica (CT) e não transgênica (CNT). Células x10³ / µL. ± (desvio padrão)

| PARAMÊTROS | Primeiro dia de vida | | Durante amamentação | | Depois da amamentação | |
|-------------------|----------------------|------------|---------------------|------------|-----------------------|------------|
| | CT | CNT | CNT | CT | CT | CNT |
| Leucócitos totais | 174.6 ± 14.7 | 15.0 ± 4.0 | 66.8 ± 21.1 | 17.0 ± 4.6 | 36.6 ± 4.0 | 15.5 ± 2.0 |
| Neutrófilos | 149.7 ± 19.3 | 12.6 ± 5.0 | 44.9 ± 20.0 | 7.2 ± 3.2 | 20.8 ± 3.4 | 6.2 ± 1.0 |
| Linfócitos | 16.9 ± 5.8 | 3.2 ± 3.3 | 20.0 ± 6.8 | 12.2 ± 6.9 | 13.5 ± 2.3 | 8.1 ± 1.6 |
| Eosinófilo | 0.7 ± 0.8 | 0.1 ± 0.2 | 0.8 ± 0.7 | 0.3 ± 0.3 | 1.9 ± 0.9 | 0.5 ± 0.2 |
| Basófilo | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| Monócito | 2.8 ± 1.0 | 0.2 ± 0.3 | 0.7 ± 0.5 | 0.1 ± 0.1 | 0.4 ± 0.2 | 0.1 ± 0.1 |

Fonte: BATISTA, R. I. T. P., et. al 2014

Tabela 4 – Valores da análise hematológica do dia 20/09 e 28/09 e média da Cabra transgênica (T.R64) e não transgênica (N.T.89). ± (desvio padrão)

| PARAMÊTROS | CABRA – N.T.89 | | | CABRA – TR64 | | |
|-----------------------------------|----------------|-------|---------------|--------------|--------|----------------|
| | 20/09 | 28/09 | MÉDIA | 20/09 | 28/09 | MÉDIA |
| Eritrócitos (x10 ⁶ µL) | 20,6 | 16,4 | 18,5 ± 20,9 | 14,2 | 13,5 | 13,9 ± 3,6 |
| Leucócitos totais (µL) | 4.550 | 8.600 | 3.287 ± 2.025 | 30.850 | 24.050 | 27.450 ± 3.400 |
| Hematócrito | 33,5% | 36,0% | 34,75% ± 1 | 24,0% | 36,0% | 30,0% ± 6 |

CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS



| | | | | | | |
|-------------------|------|------|-------------|------|------|-------------|
| Neutrófilo | 77% | 71% | 74% ± 3 | 83% | 78% | 80,5% ± 2,5 |
| Linfócito | 19% | 20% | 19,5% ± 0.5 | 16% | 18% | 17,0% ± 1 |
| Eosinófilo | 4,0% | 8,0% | 6,0% ± 2 | 1,0% | 4,0% | 2,5% ± 1,5 |
| Monócito | 0% | 1,0% | 0,5% ± 0.5 | 0% | 0% | 0% ± 0 |

O Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humanos (hG-CSF) segundo Batista (2014), atua estimulando a neutropoiese juntamente com a função de neutrófilos circulantes e aumentando a resposta antimicrobiana em pacientes submetidos a tratamento oncogênico de neutropenia induzida por quimioterapia. Conforme exemplificado por Batista, R. I. T. P., et. al 2014 os valores do Leucograma da cabra transgênica para hG-CSF quando comparados com outra cabra não transgênica na fase jovem e adulta tendem a se apresentar discretamente mais altos em virtude da transgênese causada em seu DNA. A comparação entre os bioquímicos não sofreu grandes alterações, levando em consideração a principal função dos exames em mensurar danos hepáticos e renais.

Tabela 5 – Valores da análise bioquímica do dia 20/09, 28/09 e média da Cabra transgênica (T.R64) e não transgênica (N.T.89). ± (desvio padrão)

| PARAMÊTROS | CABRA N.T.89 | | | CABRA T. R64 | | |
|-------------------|--------------|-------|--------------|--------------|-------|----------------|
| | 20/09 | 28/09 | MÉDIA | 20/09 | 28/09 | MÉDIA |
| ALT | 17,8 | 14,7 | 32,5 ± 4,15 | 21,77 | 25,8 | 29,15 ± 26,30 |
| ALP | 133,7 | 196,0 | 164,8 ± 78,5 | 141,8 | 138,2 | 140,0 ± 67,29 |
| Creatinina | 0,2 | 0,5 | 0,32 ± 2,0 | 0,2 | 0,2 | 0,2 ± 1,0 |
| Ureia | 75,6 | 167,5 | 121,5 ± 66,1 | 82,4 | 160,5 | 121,45 ± 64,44 |

Testes bioquímicos são incluídos com frequência nas análises laboratoriais e, assim como o hemograma, têm como objetivo a avaliação geral da saúde do animal. Ademais, existem variáveis que podem exercer maior influência nos resultados dos testes bioquímicos, como o fotoperiodismo, temperatura, diferentes tipos de manejo, métodos de coleta, emprego de diferentes técnicas laboratoriais para análise e equipamentos utilizados (BUSH, 2004; THRALL, M. A. et. al., 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cabra transgênica apresentou leucocitose e demais parâmetros do leucograma elevados quando comparados com o da cabra não

transgênica. O eritrograma apresentou valores divergentes entre os animais do estudo. Vale ressaltar que mesmo para a cabra não transgênica utilizada no estudo, os valores referenciais da literatura não corroboraram com os resultados obtidos, enfatizando a necessidade de se considerar fatores exógenos que podem estar influenciando nesses parâmetros.

Os valores divergentes encontrados no presente estudo podem ser justificados pelo fato de que em outros estudos os animais utilizados são exóticos, enquanto a raça utilizada no presente estudo é de origem nativa. Quanto aos exames bioquímicos, observa-se uma discreta diferença entre as cabras, ainda que não deletéria, haja visto que ambas estão sobre o mesmo manejo. Pelo exposto, ressalta-se a importância de mais estudos para melhor compreensão do comportamento hematológico de animais transgênicos.

REFERÊNCIAS

BATISTA, RIBRIO IVAN TAVARES PEREIRA. Características Genótípicas e Fenotípicas de Caprinos Transgênicos Expressando o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos Humano (hG-CSF) na Glândula Mamária. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (PPGGV). Fortaleza. 2014. Disponível em: <<http://www.uece.br/ppgc/pesquisa/teses/teses-de-2014/>> . Acesso: 15 de Setembro de 2021.

BUSH, B. M; Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. 1 ed. São Paulo-SP. Roca, 2004.

FREITAS, V. J. F., MELO, L. M., BATISTA, R. I T. P., SOUZA-FABJAN, J. M. G., TEIXEIRA, D. I. A. Transgênese em Caprinos. v. 8. P. 402 – 406. Acta Veterinária Brasileira. 2014. Disponível em: < <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/3961>>. Acesso em: 15 de Setembro de 2021.

FREITAS, VICENTE J.F. et al. Produção de cabra transgênica (*Capra hircus*) como gene do fator estimulador de colônias de granulócitos humanos (hG-CSF) no Brasil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 79, p. 585-592. 2007

SILVA, NORO M. Hematologia Veterinária. Belém – PA. AEDI-UFPA. 2017

THRALL, MARY A. *et al.* Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2º ed. ROCA. São Paulo – SP, 2015

WEISS, D. J. & WARDROP, J. Schalm's Veterinary Hematology. 6º ed. 2011.