UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

LETÍCIA DOS SANTOS NASCIMENTO

Edição gênica CRISPR-Cas9 otimizada com ssODNs para produção de fibronectina humana recombinante em células epiteliais da glândula mamária bovina

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
FEVEREIRO, 2026

Edição gênica CRISPR-Cas9 otimizada com ssODNs para produção de fibronectina humana recombinante em células epiteliais da glândula mamária bovina

LETÍCIA DOS SANTOS NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Álvaro Fabricio Lopes Rios

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

N244 Nascimento, Leticia dos Santos.

Edição gênica CRISPR-Cas9 otimizada com ssODNs para produção de fibronectina humana recombinante em células epiteliais da glândula mamária bovina. / Leticia dos Santos Nascimento. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

80 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.
Orientador: Álvaro Fabrício Lopes Rios.

1. Biorreatores celulares. 2. Bovinos transgênicos. 3. Biofármacos. 4. Edição gênica. 5. Plasmídeo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Edição gênica CRISPR-Cas9 otimizada com ssODNs para produção de fibronectina humana recombinante em células epiteliais da glândula mamária bovina

LETÍCIA DOS SANTOS NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2026

Comissão examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
HYAGO PASSE PEREIRA
Data: 20/05/2026 18:47:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Hyago Passe Pereira – Embrapa Gado de Leite/ Estácio JF

gov.br Documento assinado digitalmente
MILTON MASAHIKO KANASHIRO
Data: 18/05/2026 12:08:05-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro – LBR/UENF

gov.br Documento assinado digitalmente
SERGIO HENRIQUE SEABRA
Data: 23/03/2026 13:54:10-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra – LBCT/UENF

gov.br Documento assinado digitalmente
ALVARO FABRICIO LOPES RIOS
Data: 25/05/2026 13:01:39-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Álvaro Fabricio Lopes Rios – LBT/UENF

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai, Wodson Carvalho do Nascimento, exemplo de dedicação, compromisso e resiliência, que sempre acreditou no poder transformador da educação e me ensinou, pelo exemplo, que o conhecimento é o caminho mais sólido para construir o futuro.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo amparo constante, pelo cuidado e pelas forças concedidas para seguir adiante e enfrentar, com fé e perseverança, os desafios vivenciados ao longo desta trajetória.

Ao meu pai, Wodson Carvalho do Nascimento, e à minha avó, Berenice Rangel de Carvalho, expresso minha mais profunda e sincera gratidão. O amor, o cuidado e o apoio incondicional de vocês foram o alicerce que me sustentou em cada etapa dessa caminhada. Sempre fizeram o possível para me oferecer as melhores oportunidades, acreditando em mim mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei, incentivando cada passo e acolhendo cada dificuldade. Tudo o que sou e construí até aqui carrega a marca da força e do amor de vocês.

À equipe do Laboratório LRMGA/LBT, incluindo os parceiros de bancada Paulo Vítor, Pethersen, Jéssica, Letícia e Anna Beatriz, deixo meu profundo agradecimento pelo suporte diário, pela colaboração científica e pela amizade construída ao longo dessa jornada. Ao professor Dr. Ângelo Burla, agradeço pela estrutura disponibilizada e pelo apoio institucional, fundamentais para a realização deste trabalho. À Drª. Paula Magnelli, expresso minha gratidão pelo suporte acadêmico, paciência e amizade.

Ao meu orientador, professor Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios, minha sincera gratidão por acreditar na minha capacidade, pelo incentivo constante, pela empatia e pela orientação dedicada, fundamentais para o meu crescimento acadêmico e científico.

À Wener e Rayane, agradeço pelo carinho, amor e amizade sincera, que tornaram essa caminhada leve.

Ao meu filho de quatro patas, Darwin, que esteve ao meu lado desde o início da graduação em Biologia, sendo minha fonte constante de força e apoio emocional, deixo meu agradecimento pelo amor incondicional.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação como mestre, expresso minha profunda gratidão pelo conhecimento compartilhado, pela dedicação e pelo papel essencial em minha trajetória acadêmica.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), minha segunda casa e verdadeira mãe acadêmica, dedico este trabalho como uma homenagem marcada por respeito e carinho.

Às instituições de fomento, CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, e CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, assim como ao PGBB – Programa de Pós-Graduação em Biociências e

Biotecnologia, e aos profissionais do CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia, expresso minha sincera gratidão pelo apoio financeiro, institucional e técnico, indispensáveis para a realização deste projeto.

Failure, in my opinion, is absolutely essential to greatness. To achieve greatness, to attain success, one must fail as many times as possible. Therefore, failure should not be avoided nor regarded as something negative. Every successful individual who has accomplished remarkable achievements—whether climbing Mount Everest, reaching the top of a company, or becoming an elite athlete—has failed more times than they can remember. It is through the lessons learned from those failures that greatness is built. No one becomes great from the very beginning. Thus, failure is an inherent part of the journey, and every failure contributes to making one stronger.

Lewis Hamilton
Seven-time Formula 1 World Champion

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

1.1 Produção de bovinos transgênicos: histórico, avanços e aplicações 12

1.2 Células bovinas como plataformas biotecnológicas para a produção de proteínas recombinantes 16

1.3 Fibronectina recombinante: engenharia de isoformas e potenciais aplicações na biomedicina 20

1.4 Sistema de Edição Gênica CRISPR-Cas9 atrelado ao uso de ssODNs 25

1.5 Lipofecção: uma ferramenta eficiente e versátil na transfecção celular 33

JUSTIFICATIVA 36

2. OBJETIVOS 37

2.1 Objetivo geral 37

2.2 Objetivos específicos 37

3. METODOLOGIA 37

3.1 Delineamento experimental 38

3.2 Desenho de vetores, sgRNAs e construção da sequência do transgene pFN1-V0/V89 39

3.3 Design dos primers para genotipagem 39

3.5 Transformação bacteriana das isoformas do plasmídeo pFN1-V0/V89 40

3.6 Cultivo de células epiteliais da glândula mamária 41

3.7 Transfecção celular por lipofectamina CRISPRMAX 42

3.8 Isolamento de colônias transgênicas 43

3.9 Análise da incorporação do transgene 45

3.9.1 Extração de DNA e genotipagem 45

3.9.2 RT-PCR e análise de transcritos 46

3.10 Análise estatística 47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

4.1 Estabelecimento e caracterização da cultura primária de células epiteliais da glândula mamária bovinas (bMECs) 47

4.2 Avaliação da incorporação genômica dos plasmídeos pFN1-V0/V89 por genotipagem molecular 52

4.3 Isolamento e expansão de colônias monoclonais transgênicas 54

5. CONCLUSÕES 56

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Animais transgênicos como biofábricas de fármacos.....14
Figura 2: Diagrama do processo de clonagem por transferência nuclear de células somáticas.....15
Figura 3: Esquema ilustrativo das vias de produção de leite em células epiteliais mamárias (MECs) durante a lactação.....18
Figura 4: Diferentes estágios de diferenciação de células epiteliais mamárias bovinas (bMECs).....19
Figura 5: Estratégia de isolamento de células epiteliais mamárias bovinas (bMECs).....20
Figura 6: Representação esquemática da estrutura modular da fibronectina (FN).....22
Figura 7: Representação esquemática da matriz extracelular (MEC) e suas interações com a superfície celular.....24
Figura 8: Representação esquemática das principais plataformas de nucleases programáveis.....26
Figura 9: Representação esquemática do sistema de edição gênica CRISPR/Cas9.....28
Figura 10: Diagrama esquemático das ferramentas de clivagem de ácidos nucleicos.....29
Figura 11: A edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas depende de vias de reparo de DNA.....30
Figura 12: Uso de ssODN como molde de reparo na edição gênica por CRISPR/Cas9..31
Figura 13: Estratégias de entrega de ácidos nucleicos em células eucarióticas.....36
Figura 14: Delineamento experimental.....39
Figura 15: Esquema de diluição limitante para isolamento de colônias celulares.....45
Figura 16: Estabelecimento do cultivo primário de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs).....49
Figura 17: Estabelecimento e diferenciação de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) em cultura na presença de matriz extracelular.....50
Figura 18: Cultivo de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) na ausência de matriz extracelular.....51
Figura 19: Análise da incorporação do transgene pFN1-V0/V89 em células bovinas.....54
Figura 20: Isolamento de colônia celular transgênica.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de animais geneticamente modificados, genes introduzidos ou deletados e os respectivos benefícios produtivos e nutricionais ao consumidor.....15

Tabela 2: Regiões para análise de transcrição e genotipagem pós-edição gênica via CRISPR-Cas9 em células bovinas.....40

LISTA DE ABREVIATURAS

ART – Assisted Reproductive Technology

BLG – beta-lactoglobulina

bMECs – bovine mammary epithelial cells

CAG – chicken beta-actin promoter

Cas – CRISPR-associated proteins

CO_2 – dióxido de carbono

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DEPC – diethyl pyrocarbonate

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimethyl sulfoxide

DNA – Deoxyribonucleic acid

dNTPs – deoxynucleotide triphosphates

DSB – Double Strand Break

ECM – extracellular matrix

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

FGF2 – Fibroblast Growth Factor 2

GFP – green fluorescent protein

HDR – Homology Directed Repair

hGH – human Growth Hormone

LB – Lysogeny broth

MEC – matriz extracelular

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

ng – nanograma

NHEJ – Non-Homologous End Joining

°C – graus Celsius

OGMs – Organismos Geneticamente Modificados

pb – pares de base

PBS – Phosphate buffered saline

PCR – polymerase chain reaction

pFN1 – plasmatic fibronectin 1

RNA – ribonucleic acid

RNP – ribonucleoprotein

rpm – rotações por minuto

RT-qPCR – reverse transcription – quantitative PCR

SCNT – Somatic Cell Nuclear Transfer

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SFB – soro fetal bovino

sgRNAs – single guide RNAs

ssODNs – single-stranded oligodeoxynucleotides

ST-nPCR – single-tube nested PCR

TALEN – Transcription Activator-like Effector Nuclease

Taq – Thermus aquaticus

Tm – temperatura de melting

UCSC – University of California, Santa Cruz

ZFNs – Zinc-finger nucleases

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

RESUMO

O uso de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) como biorreatores constitui uma estratégia promissora para a produção de proteínas recombinantes, devido à sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais essenciais à funcionalidade biológica. Entre essas proteínas, a fibronectina humana recombinante (pFN1) destaca-se como uma glicoproteína da matriz extracelular envolvida em processos de adesão celular, migração e regeneração tecidual, com potencial aplicação na produção de cola de fibrina, um selante biológico amplamente utilizado em procedimentos cirúrgicos para promoção da hemostasia. Neste contexto, objetivou-se realizar a edição gênica de bMECs para expressão das isoformas V0 e V89 da fibronectina humana recombinante (pFN1), utilizando o sistema CRISPR-Cas9 associado a oligonucleotídeos de fita simples (ssODNs). Os ssODNs foram empregados para aumentar a especificidade de reconhecimento da Cas9 e atuar como molde para reparo por recombinação homóloga (HDR), visando maior eficiência de integração gênica. Os plasmídeos pFN1-V0/V89 foram propagados em *Escherichia coli* DH5α, seguidos de extração e purificação. As bMECs foram obtidas a partir de tecido da glândula mamária bovina por digestão enzimática e cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino, antifúngico, antibióticos e hormônios para indução da lactação. As células foram mantidas em placas tratadas com matriz extracelular Gel Trex para favorecer a diferenciação celular. Após atingirem confluência, foram submetidas à lipofecção utilizando Lipofectamina CRISPRMAX, Cas9 D10A Nickase, sgRNAs e ssODNs direcionados ao *locus* ROSA26. A eficiência da edição foi avaliada por genotipagem (ST-nPCR) e análise de expressão por RT-qPCR. O cultivo em matriz Gel Trex permitiu o estabelecimento de uma cultura homogênea de bMECs em aproximadamente três dias, com elevados níveis de organização e diferenciação epitelial, superiores aos observados em células cultivadas diretamente em substrato plástico. A genotipagem das bMECs lipofectadas com pFN1V0/V89 revelou, por eletroforese, um fragmento de aproximadamente 1000pb correspondente à região BLG-ROSA26, indicando a integração do transgene no genoma celular. Adicionalmente, a análise por RT-qPCR confirmou a presença dos transcritos das isoformas V0/V89 em células transfectadas. Os resultados confirmaram a inserção direcionada do transgene e a expressão das isoformas da pFN1 em bMECs, evidenciando o potencial dessas células como modelo *in vitro* para produção de biofármacos e destacando a contribuição dos ssODNs para a eficiência do sistema CRISPR-Cas9.

Palavras-chave: biorreatores celulares; bovinos transgênicos; edição gênica; biofármacos;

ABSTRACT

The use of bovine mammary epithelial cells (bMECs) as bioreactors represents a promising strategy for the production of recombinant proteins due to their ability to perform post-translational modifications that are essential for biological functionality. Among these proteins, recombinant human fibronectin (pFN1) stands out as an extracellular matrix glycoprotein involved in cell adhesion, migration, and tissue regeneration, with potential applications in the production of fibrin glue, a biological sealant widely used in surgical procedures to promote hemostasis. In this context, this study aimed to perform gene editing in bMECs to enable the expression of the V0 and V89 isoforms of recombinant human fibronectin (pFN1) using the CRISPR-Cas9 system associated with single-stranded oligonucleotides (ssODNs). The ssODNs were employed to increase Cas9 recognition specificity and to act as templates for homology-directed repair (HDR), aiming to enhance gene integration efficiency. The pFN1-V0/V89 plasmids were propagated in *Escherichia coli* DH5α, followed by DNA extraction and purification. bMECs were obtained from bovine mammary gland tissue through enzymatic digestion and cultured in DMEM/F12 medium supplemented with fetal bovine serum, antifungal agents, antibiotics, and lactogenic hormones. Cells were maintained on plates coated with the extracellular matrix Gel Trex to promote cellular differentiation. After reaching confluence, cells were subjected to lipofection using Lipofectamine CRISPRMAX in combination with Cas9 D10A nickase, sgRNAs, and ssODNs targeting the ROSA26 locus. Editing efficiency was evaluated by genotyping (ST-nPCR) and gene expression analysis by RT-qPCR. Cultivation on Gel Trex matrix enabled the establishment of a homogeneous bMEC culture within approximately three days, exhibiting high levels of epithelial organization and differentiation, superior to those observed in cells cultured directly on plastic substrates. Genotyping of bMECs lipofected with pFN1V0/V89 revealed, by electrophoresis, a fragment of approximately 1000 bp corresponding to the BLG-ROSA26 region, indicating successful integration of the transgene into the cellular genome. Additionally, RT-qPCR analysis confirmed the presence of transcripts corresponding to the V0 and V89 isoforms in transfected cells. These results confirmed the targeted insertion of the transgene and the expression of recombinant human fibronectin isoforms in bMECs, demonstrating the potential of these cells as an *in vitro* model for biopharmaceutical production and highlighting the contribution of ssODNs to improving the efficiency of the CRISPR-Cas9 system.

Keywords: cell bioreactors; transgenic bovines; genetic editing; bio-pharmaceutica.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produção de bovinos transgênicos: histórico, avanços e aplicações

A capacidade de modificar moléculas de DNA em mamíferos surgiu na década de 1970, com o advento da tecnologia do DNA recombinante (Murray et al., 2010). Nos anos seguintes, entre as décadas de 1970 e 1980, as técnicas de engenharia genética avançaram rapidamente, mas apenas a partir de 1980 começaram a se consolidar métodos mais eficientes para a introdução de construções de DNA em organismos, os quais evoluíram de forma significativa nas duas décadas seguintes (Shakweer et al., 2023). Inicialmente, era possível apenas inserir transgenes de diferentes formatos, incluindo cromossomos artificiais, em diversas espécies de vertebrados, ou induzir mutações específicas, principalmente em camundongos, por meio da recombinação homóloga em células-tronco embrionárias (ES). Esses primeiros avanços estabeleceram as bases para a transgenia animal, mas eram limitados em eficiência e aplicabilidade (Liu et al., 2025).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos cujo material genético foi alterado por técnicas de engenharia genética que não ocorrem naturalmente por cruzamento ou recombinação natural (WHO, 2014). De forma semelhante, a Food and Agriculture Organization (FAO) define OGMs como organismos que tiveram uma ou mais sequências de DNA introduzidas ou modificadas por meio de biotecnologia moderna (FAO, 2001). Essas modificações incluem a inserção de sequências exógenas (transgenia), a introdução de genes da mesma espécie ou de espécies sexualmente compatíveis (cisgenia ou intragenia), além de alterações dirigidas por técnicas de edição gênica ou silenciamento gênico mediado por RNA interferente (Holme et al., 2013; Jaganathan et al., 2018).

A produção de bovinos transgênicos emergiu no início da década de 1990 como uma estratégia inovadora para o melhoramento genético de animais de produção. As primeiras aplicações da transgenia tinham como foco principal a introdução de genes capazes de aprimorar características zootécnicas, como o aumento da taxa de crescimento, a melhoria da eficiência reprodutiva, a alteração da composição corporal (com ênfase no ganho de massa muscular e na redução de gordura) e a elevação da resistência a doenças infecciosas (Abate, 2017). Genes relacionados ao hormônio do crescimento, por exemplo, foram amplamente estudados como alvos para intensificar o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho (Shakweer et al., 2015). Essas estratégias refletem a necessidade da época de atender à crescente demanda mundial por alimentos de origem animal de forma mais eficiente e economicamente viável.

Paralelamente a esses avanços, a transgenia passou a ser explorada em uma perspectiva biomédica, especialmente no contexto da produção de proteínas recombinantes de interesse terapêutico. O método pioneiro utilizado para esse fim foi a microinjeção pronuclear, que consistia na inserção direta de sequências de DNA exógeno no pronúcleo de zigotos fertilizados *in vitro* (Tan et al., 2020). Embora tenha sido um marco para a biotecnologia animal, a técnica exibe baixa eficiência — em bovinos e outros animais de produção, tipicamente ~1 % dos embriões injetados resultam em animais transgênicos — além de alta taxa de perdas embrionárias durante as etapas de manipulação e transferência para receptoras (Shakweer et al., 2023). Apesar dessas limitações, foi possível gerar os primeiros modelos de bovinos capazes de secretar proteínas heterólogas no leite, demonstrando o potencial da glândula mamária como biorreator natural para a produção de biomoléculas de alto valor agregado.

Em 1991, Krimpenfort et al. descreveram um dos primeiros experimentos bem-sucedidos nesse campo, ao gerar vacas transgênicas capazes de expressar lactoferrina humana no leite. Esse marco evidenciou a viabilidade da transgenia animal como plataforma para biofármacos e abriu caminho para a produção de outras proteínas terapêuticas, incluindo fatores de coagulação e hormônios de interesse clínico (Karatzas et al., 2003). Desde então, a biotecnologia aplicada a bovinos transgênicos expandiu-se tanto no âmbito zootécnico quanto biomédico, consolidando esses animais como importantes modelos para a agricultura, a saúde e a indústria farmacêutica.

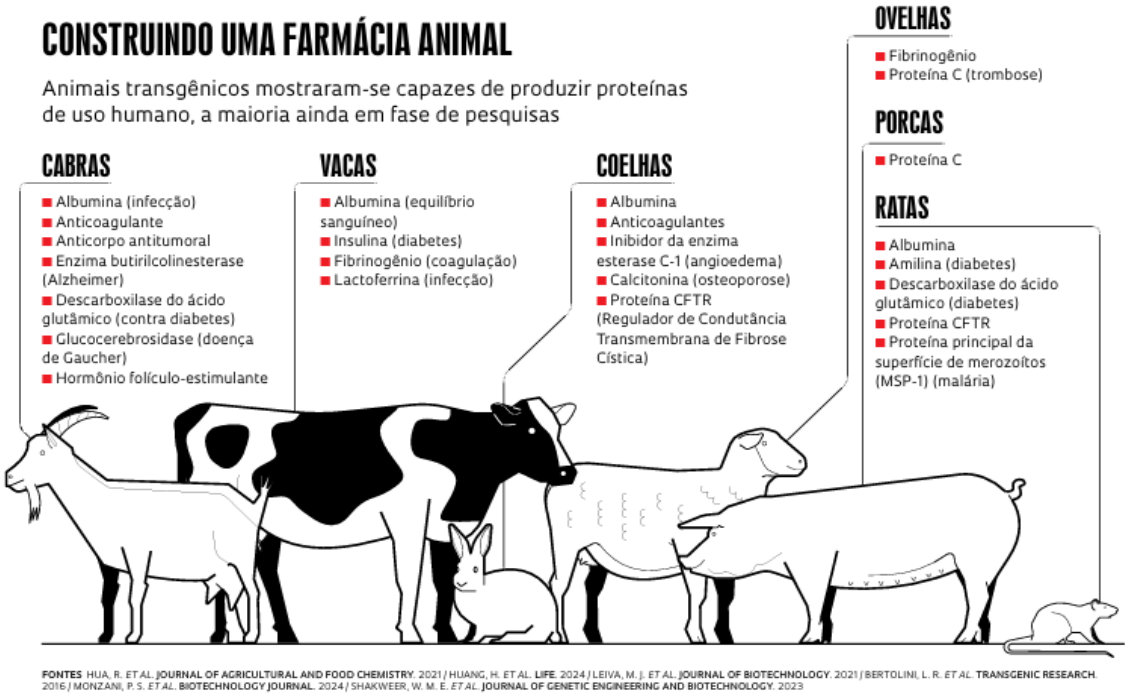


Figura 1: Animais transgênicos como biofábricas de fármacos. Animais geneticamente modificados, como cabras, vacas, coelhos, ovelhas, porcos e ratos, vêm sendo utilizados na produção de proteínas de

interesse farmacêutico humano, como insulina, albumina, antitrombina, lactoferrina, entre outras. A maioria desses produtos ainda se encontra em fase experimental ou de pesquisa clínica. Fonte: Pesquisa FAPESP, 2023.

Com o avanço da tecnologia, a transferência nuclear de células somáticas (SCNT) despontou no final dos anos 1990 e início dos anos 2000 como um método mais versátil para a geração de animais geneticamente modificados (Hodges et al., 2003). Essa técnica, notabilizada pelo nascimento da ovelha Dolly em 1996, permitia a substituição do núcleo de um oócito enucleado pelo núcleo de uma célula somática previamente manipulada *in vitro*. A SCNT viabilizou a seleção prévia de células contendo a modificação gênica desejada antes da etapa de clonagem, aumentando o controle sobre a integração do transgene e reduzindo a variabilidade genética entre indivíduos (Wilmut et al., 2015). Nos bovinos, isso possibilitou a produção de linhagens transgênicas mais previsíveis e com expressão direcionada por promotores específicos, como o da β-caseína, para secreção de proteínas no leite (Monzani et al., 2024).

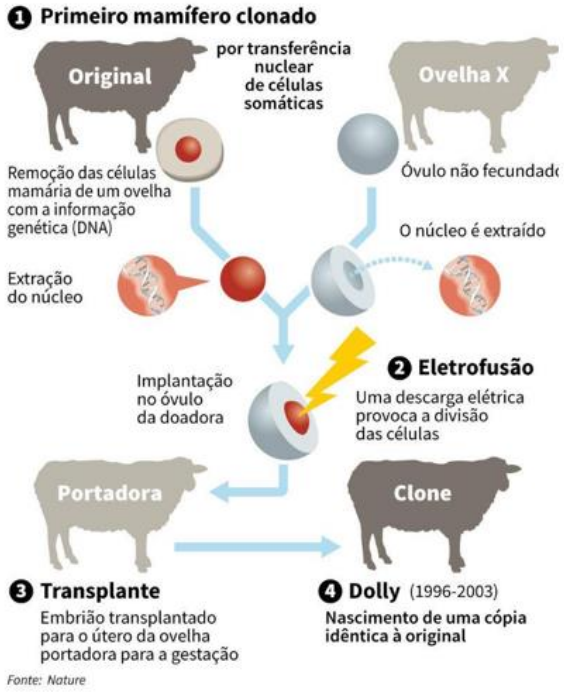


Figura 2: Diagrama do processo de clonagem por transferência nuclear de células somáticas. Fonte: Campbell et al., 1996, Nature.

Apesar desses avanços, os métodos iniciais de transgênese em bovinos enfrentam gargalos significativos. A baixa eficiência global continuou sendo um desafio, mesmo com o uso da SCNT, demandando elevado investimento financeiro, infraestrutura especializada e mão de obra qualificada (Malin et al., 2022). Além disso, os longos períodos de gestação bovina tornavam o desenvolvimento de linhagens transgênicas um processo demorado, levando anos entre a concepção do projeto e a obtenção de um animal

funcional capaz de produzir a proteína de interesse. Questões relacionadas ao bem-estar animal, à regulação de organismos geneticamente modificados (OGMs) e à aceitação pública também representaram barreiras importantes (Akagi et al., 2014).

No Brasil, a pesquisa em transgenia animal ganhou destaque a partir dos anos 2000, com instituições públicas e privadas realizando estudos com alto impacto científico e tecnológico. Entre os marcos, destaca-se a geração de bovinos transgênicos produtores do fator IX da coagulação humana, visando o tratamento da hemofilia B, resultado de uma colaboração entre a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), a Universidade de Brasília (UnB), a Escola Paulista de Medicina (Unifesp) e o Hospital de Apoio de Brasília (Embrapa, 2005). Outro projeto relevante foi a produção de caprinos expressando lactoferrina humana, conduzido pela Universidade de Fortaleza (Unifor) em parceria com a Universidade da Califórnia em Davis, aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (Martins et al., 2015). Além disso, pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP) e da Universidade Norte do Paraná (Unopar) desenvolveram vacas transgênicas capazes de expressar insulina humana no leite, sendo o primeiro animal geneticamente modificado com o gene da pró-insulina humana nascido em 2014 (Meirelles et al., 2024).

Animal	Genes introduzidos ou deletados	Critérios de desempenho (benefício ao consumidor)
Bovino	caseína β e κ	A expressão da proteína caseína aumentou (melhorou o conteúdo de proteína do leite)
Bovino	Lactase intestinal	A lactose no leite está sendo reduzida (pessoas intolerantes à lactose)
Bovino	Lisostafina	Resistência à mastite (uso reduzido de antibióticos)
Bovino	β -lactoglobulina	Maior produção de leite dessa proteína, bem como maior crescimento e resistência a doenças em bezerros alimentados com leite (uso reduzido de antibióticos e melhores benefícios à saúde)
Ovino	Hormônio do crescimento	Aumento das taxas de crescimento, melhor eficiência de conversão alimentar, menor teor de gordura na carcaça e maiores taxas de lactação (carne mais magra)
Ovino	Miostatina	Em ovelhas, a expressão da miostatina foi reduzida e a massa muscular foi aumentada (carne mais magra)
Suíno	Fator de crescimento semelhante à insulina 1	Aumento da taxa de crescimento e menor teor de gordura na carcaça (carne mais magra)
Suíno	α -Lactalbumina	A taxa de crescimento dos leitões aumentou e sua saúde melhorou

Quadro 1: Exemplos de animais geneticamente modificados, genes introduzidos ou deletados e os respectivos benefícios produtivos e nutricionais ao consumidor.

Essa trajetória demonstra que a transgenia bovina tem potencial para transformar o leite em um biorreator natural para a produção de proteínas recombinantes, representando um avanço significativo na interface entre agropecuária e biotecnologia aplicada à saúde (Collares et al., 2007). Contudo, as limitações inerentes aos modelos *in vivo* impulsionaram o desenvolvimento de estratégias *in vitro*, baseadas em biorreatores celulares, que oferecem maior controle, menor custo e maior rapidez no estabelecimento de linhagens produtoras (Noseda et al., 2016).

1.2 Células bovinas como plataformas biotecnológicas para a produção de proteínas recombinantes.

A geração de bovinos biorreatores é um processo biotecnológico de alto custo e complexidade, que exige múltiplas etapas, desde a manipulação *in vitro* de embriões e a preparação de fêmeas receptoras até o acompanhamento clínico durante a gestação e o período pós-natal (Monzani et al., 2016). O longo período gestacional, a necessidade de infraestrutura especializada, a manutenção de numerosos animais receptores e os elevados custos envolvidos tornam essa abordagem logisticamente e economicamente desafiadora. Após o nascimento, ainda são necessários cerca de 18 meses para que o animal atinja maturidade suficiente para indução da lactação e posterior avaliação da expressão da proteína de interesse (Asfaw & Assefa, 2019). Assim, o ciclo completo, desde a construção do transgene até a confirmação da expressão proteica no leite, pode ultrapassar 30 meses, demandando recursos econômicos expressivos (Deykin et al., 2021).

Sob a perspectiva biológica, diversos entraves ainda persistem. A inserção aleatória do transgene no genoma pode provocar efeitos de posição, como a repressão da expressão gênica, além de acarretar modificações na organização genômica que comprometem tanto a viabilidade celular quanto o desenvolvimento embrionário (Yin et al., 2012). Aspectos relacionados à biossegurança também merecem atenção, especialmente o risco de contaminação por agentes zoonóticos ao longo da produção e do processo de purificação das proteínas recombinantes (Bertolini et al., 2016). Frente a essas limitações, vêm sendo exploradas alternativas *in vitro,* capazes de mimetizar as funções secretoras do tecido mamário de maneira mais ágil, controlada e passível de escalonamento.

Como alternativa, células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs: bovine Mammary gland Epithelial Cells) surgem como uma plataforma eficiente para a produção de proteínas recombinantes. Essas células possuem toda a maquinaria necessária para síntese e modificação pós-traducional de proteínas, incluindo glicosilação, fundamental para a funcionalidade biológica (Xu et al., 2021; Janne et al., 1994). De acordo com Fu et al. (2014), a suplementação do meio de cultura com hormônios, como a insulina, bem como o uso de sistemas baseados em matrizes de colágeno, pode favorecer a diferenciação funcional das células e possibilitar níveis de produção de proteínas comparáveis aos observados no tecido mamário *in vivo*. O Matrigel, uma preparação composta por diversas proteínas da matriz extracelular secretadas por células de sarcoma murino, atua como um análogo da membrana basal, promovendo a adesão e favorecendo a diferenciação celular (Kibbey, 1994). Esse suporte estrutural permite que as células epiteliais recuperem um estado mais próximo do lactogênico em comparação ao cultivo convencional em

monocamada sobre plástico (Mroue & Bissell, 2013).

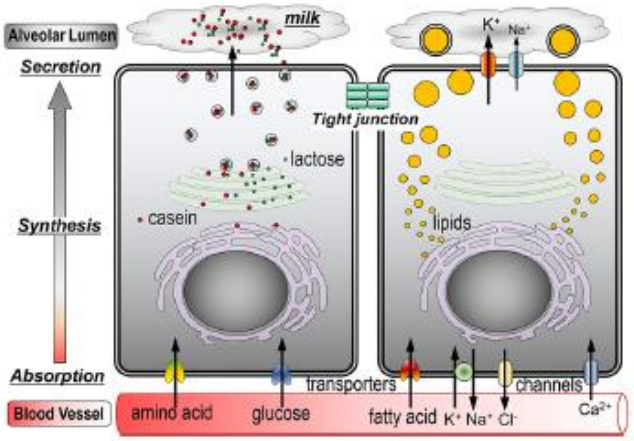


Figura 3: Esquema ilustrativo das vias de produção de leite em células epiteliais mamárias (MECs) durante a lactação. As BMECs absorvem nutrientes e íons por meio de canais e transportadores na membrana basolateral. Em seguida, sintetizam proteínas do leite, lactose e lipídios no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, secretando-os no lúmen alveolar pela membrana apical. As tight junctions (TJs) bloqueiam o extravasamento de componentes do sangue e do leite pelas vias paracelulares entre as MECs. *Fonte: Adaptado de KOBAYASHI (2023).*

O cultivo de bMECs em matrizes extracelulares tem se mostrado essencial para a manutenção das propriedades estruturais e funcionais dessas células, uma vez que a matriz influencia diretamente a adesão, a morfologia e a polaridade celular, fatores cruciais para preservar a diferenciação e o comportamento fisiológico (Giassetti et al., 2017). Em contrapartida, sistemas bidimensionais convencionais, como culturas em plástico, frequentemente levam à perda de viabilidade e alterações fenotípicas ao longo das passagens (Bach et al., 2017). Sob condições tridimensionais, entretanto, as bMECs tendem a se organizar em estruturas mais complexas, como organoides, que reproduzem de forma mais fiel a arquitetura e o microambiente do epitélio mamário *in vivo* (Kobayashi, 2023).

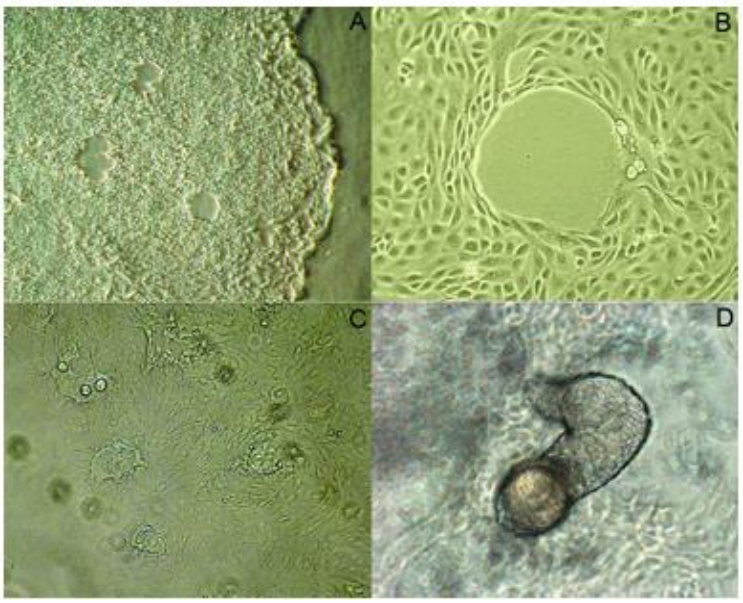


Figura 4: Diferentes estágios de diferenciação de células epiteliais mamárias bovinas (bMECs). (A) Formação da estrutura semelhante a lúmen ao redor da célula (10×4); (B) Detalhe da estrutura semelhante a lúmen (10×10); (C) Estágio inicial da formação de estruturas lobulares, por volta de nove dias em cultivo (10×10); (D) Estrutura semelhante a lóbulos após cerca de 60 dias de cultivo em matriz extracelular não diluída (10×4). *Fonte: MONZANI et al. (2016).*

Além da matriz, fatores hormonais também desempenham papel central na regulação do comportamento das bMECs. A suplementação das culturas com hormônios lactogênicos, como prolactina e glicocorticoides, é prática recorrente para induzir ou manter, ainda que parcialmente, o fenótipo secretor dessas células (Muroya et al., 2016). Quando essa estimulação é combinada à reconstrução da estrutura alveolar em sistemas tridimensionais, em associação com os sinais provenientes da matriz extracelular, observa-se uma expressão gênica em níveis comparáveis aos do tecido mamário durante a lactação (Fu et al., 2014).

Entretanto, a complexidade da glândula mamária representa um desafio adicional. Trata-se de um órgão secretor formado por diferentes tipos celulares, como as células epiteliais responsáveis pela rede ductal, os adipócitos que fornecem sustentação estrutural e células estromais e imunológicas, semelhantes a fibroblastos. Essa diversidade dificulta o isolamento e a purificação das bMECs, de modo que as preparações primárias frequentemente sofrem contaminação por fibroblastos e células de gordura, comprometendo a homogeneidade e a estabilidade dos cultivos (Moody et al., 2023). Atualmente, os dois métodos mais utilizados para o isolamento e cultivo de bMECs *in vitro* são a cultura em fragmentos de tecido e a digestão enzimática (Kaavya et al., 2016; Hamzaoui et al., 2018). O cultivo a partir de blocos de tecido apresenta vantagens como simplicidade técnica, preservação da integridade celular e baixa taxa de mortalidade. Contudo, trata-se de um processo demorado na ausência de matriz extracelular e de baixa

pureza, já que as bMECs obtidas tendem a vir acompanhadas de outros tipos celulares, com fibroblastos de forma majoritária, exigindo digestões seriadas com tripsina por duas a três gerações para enriquecer a população de interesse. Ainda assim, a contaminação residual pode comprometer análises subsequentes (Qian et al., 2024).

Por sua vez, a digestão enzimática é considerada mais rápida e prática, permitindo a liberação de células de forma relativamente eficiente. Entretanto, períodos prolongados de exposição às enzimas podem provocar danos significativos às bMECs, além de favorecer a proliferação de fibroblastos, que apresentam maior viabilidade e taxa de crescimento. Como resultado, culturas estabelecidas por esse método frequentemente apresentam composição heterogênea, o que limita sua aplicabilidade em estudos experimentais mais rigorosos (Skog et al., 2019).

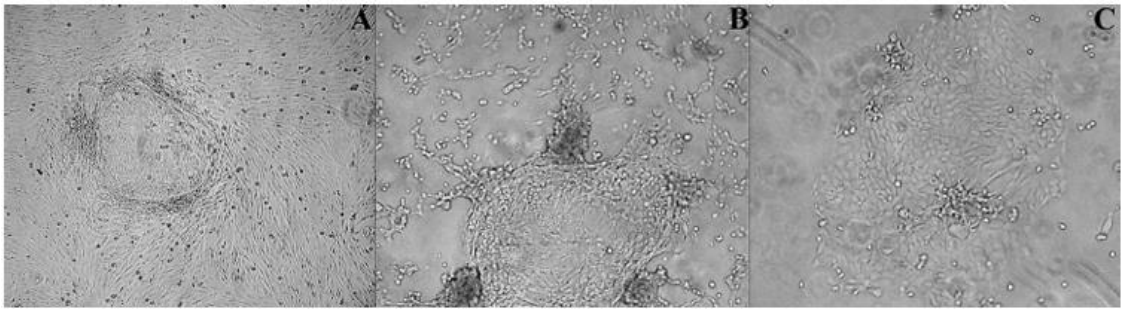


Figura 5: Estratégia de isolamento de células epiteliais mamárias bovinas (bMECs). (A) Cultura celular a partir de tecido mamário mostrando fibroblastos e colônias de células epiteliais; (B) Cultura após tratamento com solução salina/EDTA, evidenciando a remoção de fibroblastos; (C) Colônia de bMECs após tratamento com tripsina, em que as células epiteliais da glândula mamária permanecem aderidas. *Fonte: MONZANI et al. (2016).*

Nesse contexto, diferentes linhagens celulares têm sido amplamente exploradas para a produção de biofármacos. As células epiteliais mamárias bovinas (bMECs) já foram utilizadas como biorreatores para secreção de proteínas recombinantes no leite, incluindo lactoferrina humana, lisozima e anticorpos monoclonais (Kaiser et al., 2017). Além delas, as células de ovário de hamster chinês (CHO) constituem a principal plataforma da indústria biofarmacêutica, sendo responsáveis pela produção de diversos anticorpos terapêuticos aprovados, como trastuzumabe (Herceptin®), bevacizumabe (Avastin®), rituximabe (Rituxan®) e adalimumabe (Humira®) (Walsh, 2018).

Já as células HEK293, derivadas de rim embrionário humano, têm sido amplamente empregadas na expressão de proteínas recombinantes humanas, como fatores de coagulação VIII e IX utilizados no tratamento da hemofilia, além de serem a plataforma escolhida para a produção de vacinas baseadas em adenovírus, incluindo a vacina contra a COVID-19 (Oxford/AstraZeneca) (Xu et al., 2021). Por sua vez, as células BHK21 (Baby Hamster Kidney) foram fundamentais na produção de vacinas virais, como a vacina

contra a poliomielite, e continuam sendo utilizadas em vacinas veterinárias e humanas, além de servirem como plataforma para a expressão de fatores de crescimento e proteínas estruturais virais (Kaavya et al., 2016; Walsh, 2018).

Ainda assim, os desafios permanecem. Entre eles, destacam-se a padronização de meios de cultura específicos, a escalabilidade dos processos de cultivo e a estabilidade genética das linhagens ao longo de múltiplas passagens. Questões regulatórias e de biossegurança também precisam ser consideradas, uma vez que produtos destinados a uso clínico humano requerem elevado rigor de validação (Lee et al., 2022). No entanto, a perspectiva futura aponta para avanços rápidos: organoides derivados de glândula mamária bovina, sistemas 3D de cultivo celular e integração com plataformas de biorreatores industriais já despontam como caminhos promissores.

1.3 Fibronectina recombinante: engenharia de isoformas e potenciais aplicações na biomedicina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína multifuncional da matriz extracelular (MEC) essencial para processos como adesão e migração celular, cicatrização de feridas e remodelamento tecidual (Zollinger et al., 2017). Essa ampla gama de funções biológicas tem despertado grande interesse na sua produção em escala laboratorial, especialmente em sistemas recombinantes, os quais permitem a geração de isoformas específicas e moléculas modificadas para atender demandas biomédicas. Diferentemente da FN derivada de plasma humano, que apresenta variabilidade entre doadores e riscos de contaminação por patógenos, a produção recombinante oferece maior padronização, segurança e versatilidade para aplicações terapêuticas e em engenharia de tecidos (Jara et al., 2020).

No organismo, a fibronectina é encontrada principalmente sob duas formas: fibronectina plasmática (pFN) e fibronectina celular (cFN), que diferem quanto à origem, composição estrutural e contexto funcional. A pFN é sintetizada predominantemente por hepatócitos e secretada diretamente na corrente sanguínea, onde circula como uma proteína solúvel. Essa forma está envolvida principalmente em processos de hemostasia e cicatrização, sendo rapidamente recrutada para o local da lesão vascular, onde se liga covalentemente à fibrina por meio de seu domínio N-terminal, contribuindo para a formação e estabilização do coágulo provisório (Potts et al., 1994; Wang e Ni, 2016).

Em contraste, a cFN é produzida localmente por diferentes tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e células do estroma, sendo secretada para o espaço extracelular, onde se organiza em fibrilas insolúveis altamente estruturadas. Essa

forma é um componente fundamental da matriz extracelular e desempenha papel central na organização do microambiente tecidual, na sinalização célula-matriz e na regulação do comportamento celular durante o desenvolvimento, a homeostase e o reparo tecidual (Patten et al., 2021).

Do ponto de vista estrutural, ambas as formas compartilham a organização básica da fibronectina, composta por dois monômeros de aproximadamente 220–250 kDa ligados por pontes dissulfeto na região C-terminal, organizados em módulos repetidos dos tipos I (FI), II (FII) e III (FIII). No entanto, as diferenças estruturais mais relevantes entre pFN e cFN decorrem do *splicing* alternativo do pré-mRNA da fibronectina, que ocorre exclusivamente na fibronectina celular. Regiões como EDA (EIIIA), EDB (EIIIB) e o segmento variável V (IIICS) são frequentemente incluídas na cFN, conferindo maior diversidade funcional e capacidade de interação com integrinas, fatores de crescimento e outros componentes da MEC (Patten et al., 2021).

A fibronectina plasmática, por sua vez, não contém os domínios EDA e EDB, sendo estruturalmente mais homogênea e especializada em funções circulatórias e hemostáticas. Essa ausência de *splicing* alternativo explica, em parte, sua menor variabilidade funcional em comparação à cFN. Já a inclusão desses domínios na fibronectina celular está associada a contextos fisiológicos e patológicos específicos, como desenvolvimento embrionário, angiogênese, inflamação, fibrose e progressão tumoral, nos quais há intensa remodelação da matriz extracelular (Ebbinghaus et al., 2004).

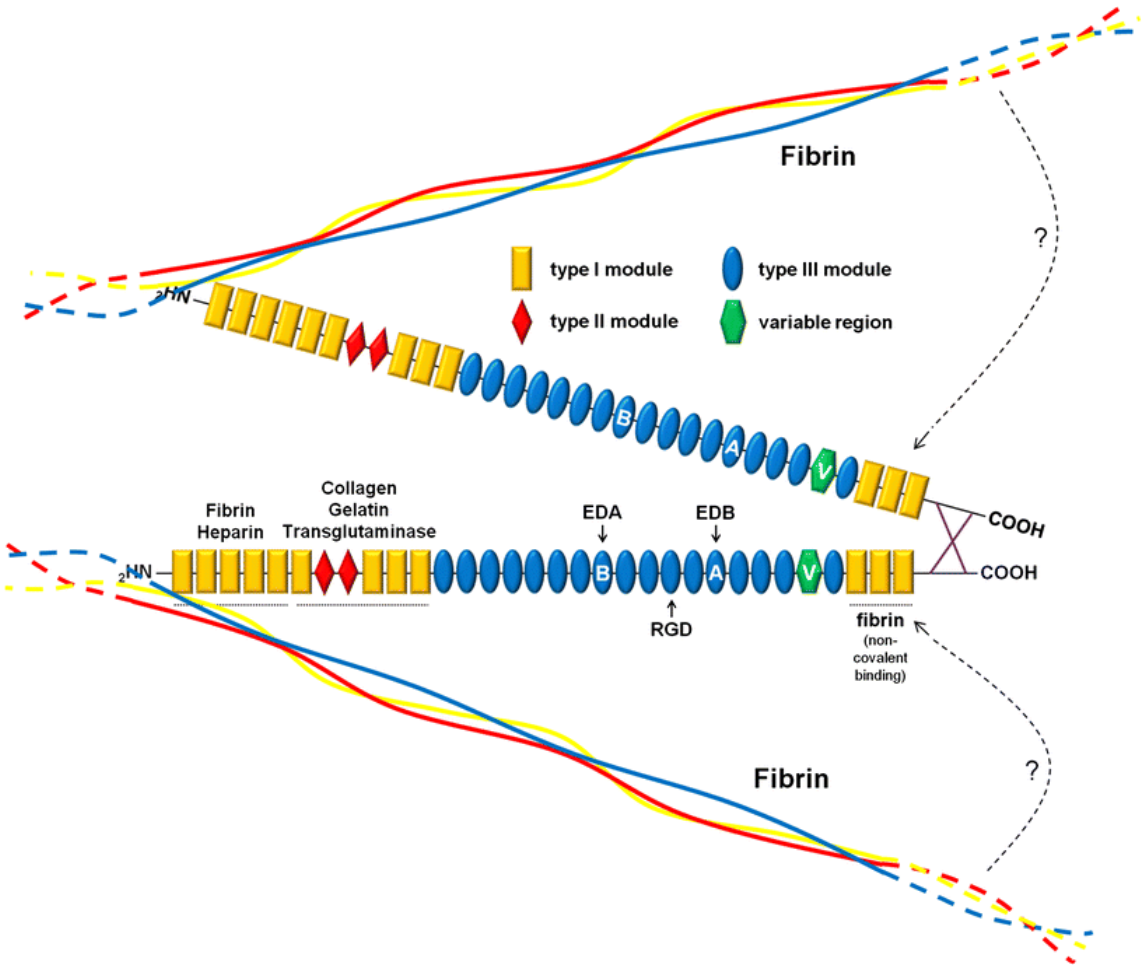


Figura 6: Representação esquemática da estrutura modular da fibronectina (FN). A fibronectina é uma glicoproteína dimérica composta por duas subunidades de aproximadamente 250 kDa. Cada monômero é constituído por três tipos de módulos homólogos, incluindo 12 módulos do tipo I, 2 módulos do tipo II e entre 15 e 17 módulos do tipo III. Dois sítios de splicing alternativo estão localizados nos módulos do tipo III, denominados EDA (Extra Domain A) e EDB (Extra Domain B). As linhas tracejadas indicam os sítios de ligação para diferentes ligantes. A fibronectina celular (cFn) pode conter os domínios EDA, EDB ou ambos, enquanto a fibronectina plasmática (pFn) não apresenta esses domínios. A região N-terminal de aproximadamente 27 kDa da fibronectina pode se ligar covalentemente à fibrina, interação que favorece a agregação lateral das fibras de fibrina. O complexo fibronectina–fibrina formado no local de lesão vascular fornece múltiplos sítios de adesão para plaquetas e outras células circulantes. Fonte: *Wang e Ni* (2016).

Nesse contexto, as isoformas V0 e V89 assumem relevância particular em aplicações biomédicas. A isoforma V0, que carece do segmento variável, apresenta maior estabilidade estrutural e resistência à degradação proteolítica, sendo especialmente útil em contextos que exigem robustez, como revestimentos de biomateriais ou implantes (Dalton et al., 2021). Já a isoforma V89, contendo uma inserção de 89 aminoácidos no domínio variável, exibe maior flexibilidade conformacional e capacidade de interação com receptores celulares, refletindo padrões observados em situações fisiológicas de reparo tecidual e angiogênese (Patten et al., 2021). Assim, enquanto a V0 tende a ser mais estável e duradoura, a V89 se destaca pelo potencial de estimular processos regenerativos, configurando um equilíbrio estratégico entre estabilidade estrutural e funcionalidade biológica.

A engenharia da fibronectina recombinante (FN-r) tem ampliado consideravelmente seu potencial biotecnológico, especialmente na exploração de isoformas associadas a processos fisiopatológicos e no desenvolvimento de biomateriais funcionalizados. A isoforma extra domain-B (ED-B) é reconhecida por sua expressão restrita durante processos angiogênicos e em muitos tipos de câncer**,** sendo praticamente ausente em tecidos normais de adultos. Essa característica tem permitido que Fn-EDB seja usada como marcador de angiogênese e como alvo molecular para entrega direcionada de agentes terapêuticos e diagnósticos em tumores sólidos (Lingasamy et al., 2025).

De modo complementar, fragmentos recombinantes da fibronectina contendo as repetições 8–10 e 12–14 do tipo III têm demonstrado desempenho superior aos peptídeos RGD quando imobilizados em ligas de titânio, promovendo maior adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais (Herranz-Diez et al., 2016). Abordagens que empregam a organização controlada de matrizes de fibronectina em superfícies de biomateriais também têm se mostrado promissoras, possibilitando a formação de andaimes biomiméticos capazes de reproduzir a arquitetura e as propriedades bioquímicas da matriz extracelular (MEC), o que favorece processos de regeneração tecidual (Llopis-Hernandez et al., 2015).

As aplicações da FN-r abrangem um amplo espectro biomédico. Em engenharia de tecidos, isoformas como a V89 são frequentemente incorporadas em *scaffolds* e hidrogéis para estimular adesão, proliferação e diferenciação celular, enquanto a isoforma V0, por apresentar maior estabilidade estrutural e resistência à degradação proteolítica, é preferencialmente utilizada em revestimentos de implantes, promovendo melhor integração com o tecido hospedeiro (Dalton et al., 2021). Na oncologia, isoformas angiogênicas, como a ED-B e a V89, têm sido exploradas como vetores de direcionamento molecular e como plataformas para a entrega controlada de agentes terapêuticos. Adicionalmente, a FN-r tem emergido como ferramenta versátil para liberação de fatores de crescimento e biomoléculas terapêuticas, devido à sua elevada afinidade por componentes da MEC e à sua capacidade de modular microambientes celulares (Zhu et al., 2014). No contexto da cicatrização tecidual, a FN-r atua em múltiplos níveis do processo reparativo: quando incorporada em formulações tópicas ou biomateriais, como colas de fibrina, interage com integrinas de superfície celular, especialmente α5β1 e αvβ3, promovendo adesão, migração e sobrevivência celular no leito da ferida (Dong et al., 2022; Gimeno-Lluch et al., 2022).

Molecularmente, a ligação da FN-r às integrinas ativa vias de sinalização intracelular, como FAK (focal adhesion kinase) e MAPK/ERK, que regulam o citoesqueleto de actina

e estimulam tanto a migração de fibroblastos para a área lesionada quanto a proliferação de queratinócitos para reepitelização (Lemmon et al., 2017). Além disso, a FN-r interage diretamente com componentes da matriz extracelular e proteínas plasmáticas, como fibrina e colágeno tipo I, funcionando como uma “ponte” molecular que organiza o arcabouço da matriz provisória. Esse processo acelera a deposição de colágeno e a formação de fibras alinhadas, fundamentais para restaurar a resistência mecânica do tecido (Garrison et al., 2021). Outro ponto importante é que a FN contém domínios que se ligam a fatores de crescimento, como VEGF e PDGF, prolongando sua retenção no microambiente da ferida e potencializando efeitos angiogênicos e de recrutamento celular (Hielscher et al., 2016).

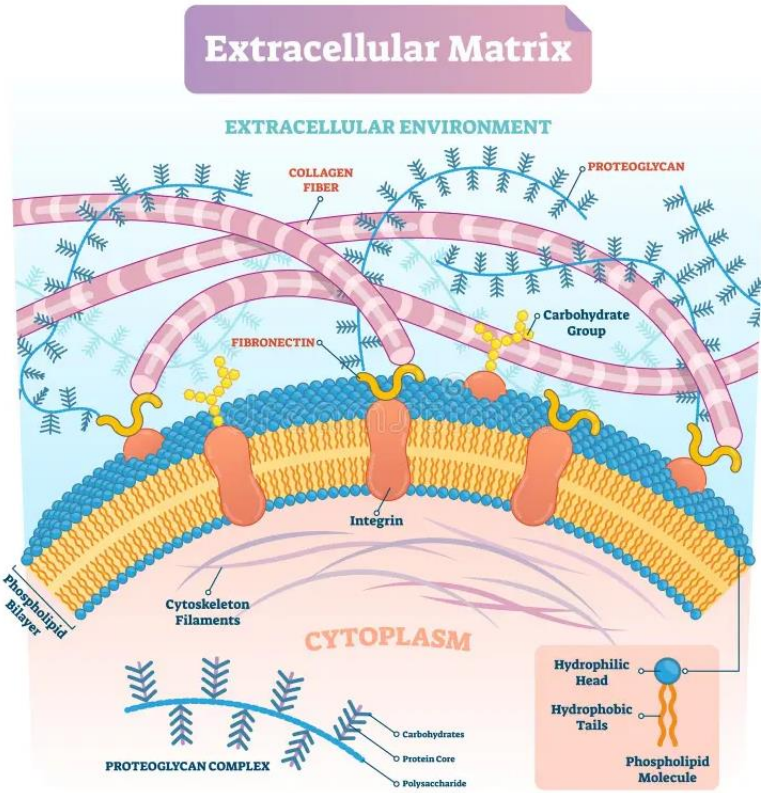


Figura 7: Representação esquemática da matriz extracelular (MEC) e suas interações com a superfície celular. A fibronectina e as fibras de colágeno compõem a rede estrutural da MEC, interagindo com integrinas presentes na membrana plasmática, que por sua vez se conectam a filamentos do citoesqueleto, estabelecendo comunicação mecânica e bioquímica entre o meio extracelular e o citoplasma. Proteoglicanos e grupos de carboidratos complementam essa interface, contribuindo para a adesão, sinalização e organização tecidual. Fonte: *Guo et al. (2023).*

A cola de fibrina, desenvolvida na década de 1970 e aprovada para uso clínico na Europa em 1972 e pelo FDA em 1998, é composta basicamente por duas frações: fibrinogênio e trombina, além de fatores acessórios como aprotinina (antifibrinolítico) e, em algumas formulações, fibronectina plasmática e fator XIII, que reforçam a adesão e a estabilidade do coágulo (Zollinger et al., 2017). Esse produto, embora eficaz, apresenta

limitações relacionadas à sua composição de origem plasmática, como risco residual de transmissão viral e variabilidade entre lotes (Miller et al., 2019). Já a abordagem baseada na fibronectina recombinante expressa em células animais permitiria maior controle sobre a isoforma utilizada (como V0 ou V89), assegurando não apenas uma maior pureza e padronização do produto, mas também a possibilidade de engenharia molecular para otimizar propriedades biológicas específicas, como maior afinidade por integrinas, retenção de fatores de crescimento e estímulo à angiogênese (Mas-Moruno et al., 2016). Essa diferenciação estrutural e funcional pode ampliar a eficácia do selante biológico, posicionando-o além de um mero hemostático, atuando também como indutor ativo de regeneração tecidual.

Para viabilizar essa estratégia, diferentes sistemas de expressão recombinante podem ser utilizados. Em bactérias como *Escherichia coli*, a produção costuma ser rápida e de alto rendimento, mas a ausência de glicosilação e o dobramento incorreto dos domínios do tipo III frequentemente resultam em proteínas insolúveis (Yin et al., 2007). Embora apresentem esses desafios, estudos comparativos indicam que *E. coli* ainda é o sistema bacteriano de maior rendimento, mas sofre com agregação proteica e formação de corpos de inclusão, o que pode limitar sua aplicação em determinadas proteínas recombinantes (Gecchele et al., 2015; Gagoski et al., 2016). Alternativamente, sistemas vegetais configuram opções versáteis e de menor custo, sendo que linhas transgênicas estáveis fornecem altos rendimentos, enquanto sistemas transitórios permitem produção mais ágil, exigindo avaliação caso a caso (Gecchele et al., 2015). Plataformas livres de células também têm sido exploradas: os extratos de *E. coli* alcançam os maiores níveis de expressão, mas frequentemente resultam em proteínas truncadas ou agregadas, ao passo que sistemas de gérmen de trigo apresentam desempenho superior entre os eucarióticos (Gagoski et al., 2016). Em contrapartida, células de mamíferos, como CHO, HEK293 ou bMECs, possibilitam a obtenção de proteínas secretadas e corretamente dobradas, embora em menor rendimento e a custos mais elevados (Hunter et al., 2019). Já os sistemas de insetos baseados em baculovírus surgem como uma alternativa intermediária, conciliando bom rendimento com processamento pós-traducional apenas parcial (Hong et al., 2022). Independentemente do sistema, etapas de purificação via cromatografia de afinidade, troca iônica ou exclusão molecular são fundamentais para garantir proteínas funcionais e livres de contaminantes (Du et al., 2022).

Apesar desse potencial, os desafios permanecem. A padronização dos protocolos de expressão, a escalabilidade do processo e o custo elevado ainda limitam a aplicação em larga escala, e, do ponto de vista regulatório, produtos destinados a uso clínico humano

exigem validação rigorosa de biossegurança, eficácia e estabilidade (Walsh, 2018). Superar essas limitações abriria caminho para o desenvolvimento de isoformas híbridas personalizadas, capazes de combinar a resistência da V0 com a atividade biológica da V89, consolidando a fibronectina recombinante como uma plataforma multifuncional na interface entre biologia celular, engenharia de proteínas e biomedicina translacional (Parisi et al., 2020). A exploração estratégica dessas isoformas pode não apenas aprimorar biomateriais e terapias regenerativas, mas também expandir aplicações em oncologia e medicina personalizada, reforçando seu papel como um alvo promissor na biotecnologia moderna.

1.4 Sistema de Edição Gênica CRISPR-Cas9 atrelado ao uso de ssODNs

A engenharia genética, desde suas primeiras aplicações, busca ferramentas capazes de editar genomas de maneira precisa, eficiente e economicamente viável. Durante décadas, estratégias como meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFNs) e TALENs (nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição) dominaram o cenário da edição gênica (Li et al., 2023). Embora tenham representado avanços significativos, essas abordagens apresentavam limitações relevantes: as meganucleases eram difíceis de reprogramar, as ZFNs dependiam de complexas interações proteína-DNA de difícil customização, e as TALENs, apesar de mais versáteis, ainda demandam construções laboriosas e de alto custo (Chang, 2022). Nesse contexto, a descoberta e adaptação do sistema CRISPR-Cas9 representou uma ruptura de paradigma, oferecendo uma alternativa de edição programável e acessível, com base em um RNA-guia sintético que direciona uma nucleasse para praticamente qualquer região do genoma (Boti et al., 2023).

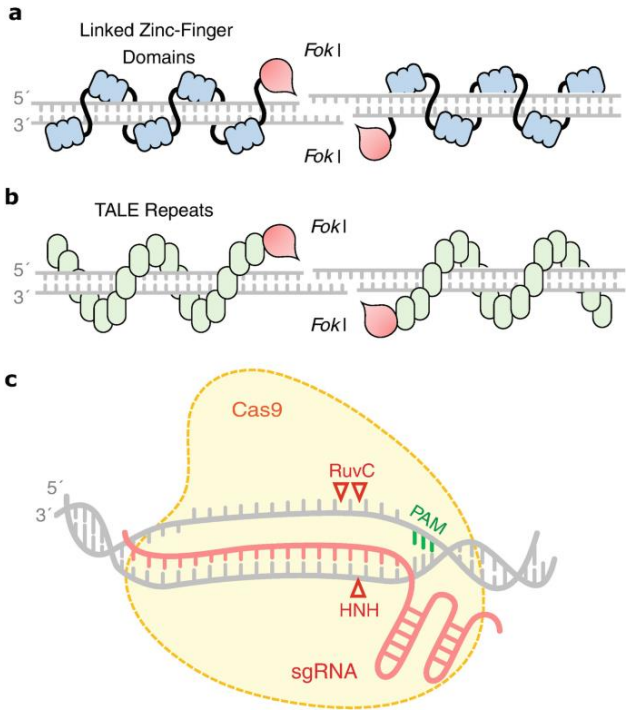


Figura 8: Representação esquemática das principais plataformas de nucleases programáveis. (a) ZFN (Zinc Finger Nucleases): cada unidade é composta por múltiplos domínios de dedo de zinco que reconhecem trincas específicas de DNA, fundidos à endonuclease FokI, cuja dimerização promove a clivagem da dupla fita. (b) TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases): repetidos domínios TALE derivados de bactérias do gênero *Xanthomonas* reconhecem sequências-alvo específicas, também associados à FokI para indução de quebras de DNA. (c) CRISPR/Cas9: complexo formado pela endonuclease Cas9 e um RNA-guia sintético (sgRNA) que direciona o pareamento com a sequência-alvo adjacente ao motivo PAM, resultando na clivagem mediada pelos domínios catalíticos RuvC e HNH. Fonte: *Shamshirgaran et al. (2022).*

A trajetória dessa tecnologia remonta à década de 1980, quando sequências repetitivas foram observadas no genoma de *Escherichia coli* sem função conhecida (Mojica et al., 2000). Somente em 2005 ficou claro que tais repetições, posteriormente denominadas CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), faziam parte de um sistema imunológico adaptativo bacteriano, capaz de registrar fragmentos de DNA de vírus e plasmídeos e usá-los como guias para reconhecer e destruir futuros invasores (Mojica et al., 2005). O passo decisivo ocorreu em 2012, quando Jinek e colaboradores demonstraram que esse mecanismo poderia ser simplificado em laboratório por meio da combinação de uma endonuclease Cas9 e um RNA-guia quimérico, abrindo a possibilidade de direcionar a clivagem a qualquer sequência desejada adjacente a um motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) (Jinek et al., 2012). Desde então, o CRISPR-Cas9 se consolidou como a principal ferramenta de edição genética, superando em popularidade e aplicabilidade todas as técnicas anteriores.

O funcionamento da maquinaria Cas9 depende do RNA-guia (sgRNA), que direciona a endonuclease ao DNA alvo. A forma mais utilizada, SpCas9, derivada de Streptococcus pyogenes, reconhece o motivo PAM “NGG”, possui aproximadamente 4,2

kb e apresenta alta eficiência em células humanas e outros modelos eucarióticos (Wu et al., 2023). Em contraste, a SaCas9, derivada de Staphylococcus aureus, é menor (~3,2 kb), reconhece um PAM diferente ("NNGRRT") e é particularmente adequada para vetores virais de capacidade limitada, como os AAV, embora possa apresentar variações de eficiência dependendo do *locus* alvo (Ran et al., 2015). Além dessas, existem nucleases derivadas de bactérias termofílicas, como algumas de Geobacillus ou ThermoCas9, que apresentam estabilidade térmica elevada e atividade em condições mais extremas, abrindo possibilidades para aplicações industriais, edição *in vitro* em temperaturas elevadas ou biotecnologia de precisão em ambientes adversos (Trasanidou et al., 2023; Harrington et al., 2017). Uma vez estabelecida a complementaridade entre sgRNA e DNA, a Cas9 promove uma quebra de dupla fita (DSB) por meio da ação de seus domínios de nucleases HNH e RuvC, cada um responsável pela clivagem de uma das fitas da dupla hélice. Essa quebra é, então, reparada pela maquinaria celular, abrindo as diferentes possibilidades de modificação genética (Babu et al., 2021).

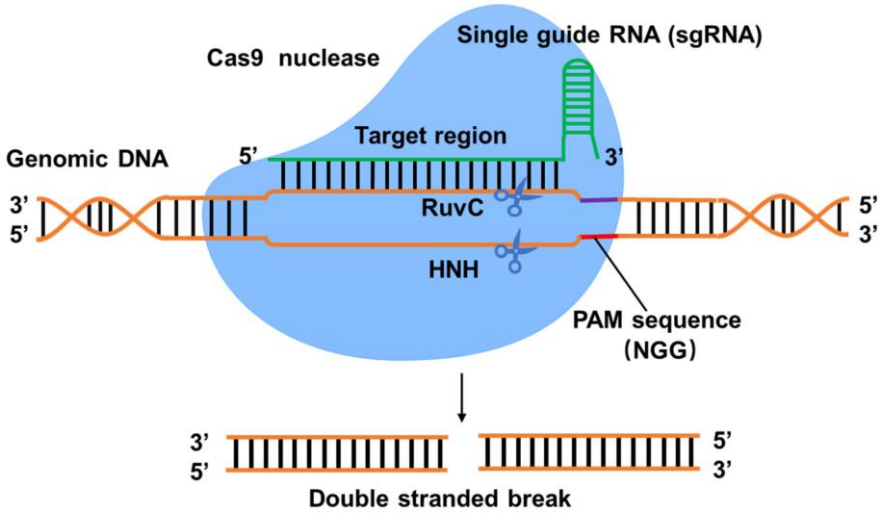


Figura 9: Representação esquemática do sistema de edição gênica CRISPR/Cas9. A endonuclease Cas9 associa-se a um RNA guia único (sgRNA), formando um complexo ribonucleoproteico capaz de reconhecer e se ligar à sequência-alvo complementar no DNA genômico. O reconhecimento depende da presença do motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), geralmente composto pela sequência NGG. Uma vez estabelecida a complementaridade entre o sgRNA e o DNA, a Cas9 promove a clivagem da dupla hélice em posições específicas — aproximadamente três pares de bases a montante do PAM — por meio de seus domínios catalíticos HNH e RuvC, que atuam respectivamente sobre as fitas senso e antissenso. O evento resulta em uma quebra de fita dupla (DSB) de extremidade romba no local-alvo, permitindo subsequentes mecanismos de reparo mediados pela célula hospedeira.

Além das variantes naturais da Cas9, a engenharia da proteína permitiu criar formas funcionais com propriedades específicas para diferentes aplicações. A Cas9 nickase (nCas9), por exemplo, contém mutações que inativam um dos domínios de nuclease, de modo que cliva apenas uma das fitas da dupla hélice, reduzindo significativamente cortes fora do alvo e permitindo estratégias de edição mais precisas,

especialmente quando utilizada em pares para gerar quebras direcionadas (Murakami et al., 2020). Já a dead Cas9 (dCas9) apresenta mutações nos dois domínios nucleases, tornando-a incapaz de cortar DNA, mas mantendo a capacidade de se ligar à sequência alvo. Essa propriedade tem sido explorada para controlar a expressão gênica, recrutando efetores epigenéticos ou transcricionais a *locus* específicos sem alterar a sequência, como demonstrado em estudos de modulação de genes humanos e de células-tronco (Dominguez et al., 2022). Outra abordagem derivada envolve a fusão de Cas9 com desaminases, dando origem ao base editing, capaz de realizar substituições pontuais de nucleotídeos sem induzir quebras de dupla fita, sendo utilizada para corrigir mutações patogênicas em modelos celulares (Dang et al., 2022). O prime editing, ainda mais recente, combina uma nickase Cas9 com uma transcriptase reversa, permitindo inserções, deleções e substituições precisas de forma eficiente e com menor risco de indels indesejados, já aplicada em correção de mutações associadas a doenças genéticas em células humanas (Anzalone et al., 2019).

Além das Cas9, outras nucleases ampliaram o leque de aplicações. A Cas12a (Cpf1) reconhece PAMs distintos, gera cortes escalonados com extremidades coesivas e permite processamento de múltiplos crRNAs a partir de um único transcrito, sendo útil para edição multiplex e inserções precisas (Hou et al., 2025). Já a Cas13 atua sobre RNA, em vez de DNA, viabilizando degradação seletiva de transcritos, regulação pós-transcricional e detecção molecular, como nos sistemas SHERLOCK e DETECTR para diagnóstico de vírus (Abudayyeh et al., 2017). Por fim, a Cas14, de tamanho extremamente reduzido (<1 kb) e alta especificidade, atua preferencialmente sobre DNA de fita simples e tem aplicações promissoras em edição de precisão e diagnóstico, especialmente em condições em que a entrega de proteínas grandes é limitada (Harrington et al., 2017). Entretanto, a efetividade dessas edições depende diretamente da resposta da célula hospedeira aos cortes induzidos, tornando essencial compreender os mecanismos de reparo do DNA, que determinam se uma modificação será introduzida de forma precisa ou se ocorrerão alterações indesejadas (Xue et al., 2021).

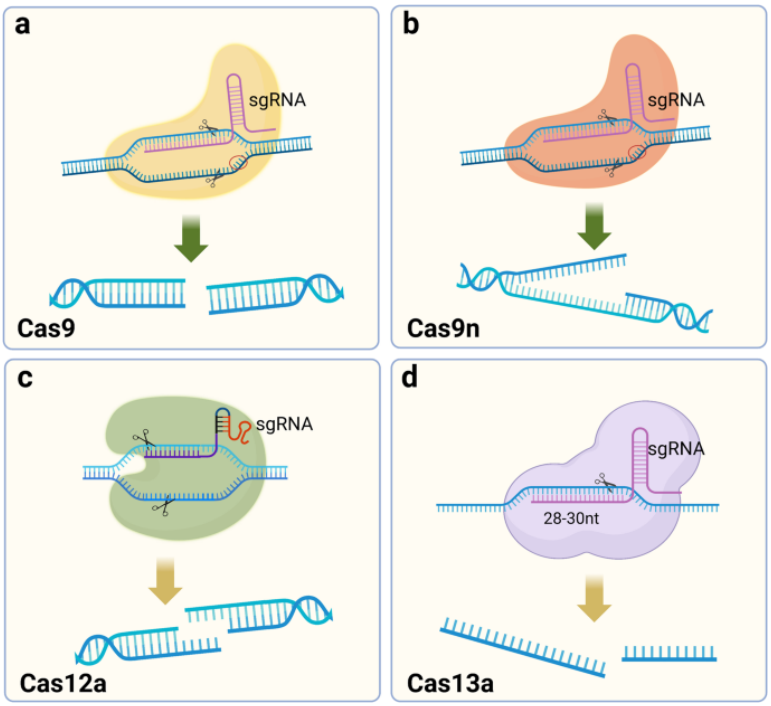


Figura 10: Diagrama esquemático das ferramentas de clivagem de ácidos nucleicos. a) Cas9 cliva as fitas duplas de DNA, gerando extremidades planas. b) Cas9 nickase (Cas9n) cliva apenas uma das fitas de DNA. c) Cas12a cliva as fitas duplas de DNA, formando extremidades coesivas (sticky ends). d) Cas13a reconhece e cliva fitas de RNA. *Fonte: Li et al., 2023.*

Dentre os mecanismos endógenos de reparo do DNA, destacam-se a junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*, NHEJ) e a recombinação homóloga (*homology-directed repair*, HDR) (Salsman et al., 2017). A NHEJ caracteriza-se por sua rapidez, embora seja suscetível à introdução de erros, frequentemente resultando em inserções ou deleções que podem comprometer a função gênica, sendo particularmente útil para estratégias de inativação de genes (*knockout*) (Guo et al., 2018). Por sua vez, a HDR possibilita a inserção precisa de sequências exógenas mediante a disponibilização de um molde homólogo, permitindo correções direcionadas de mutações ou a introdução de novos genes *(knockin)* (Zhang et al., 2017).

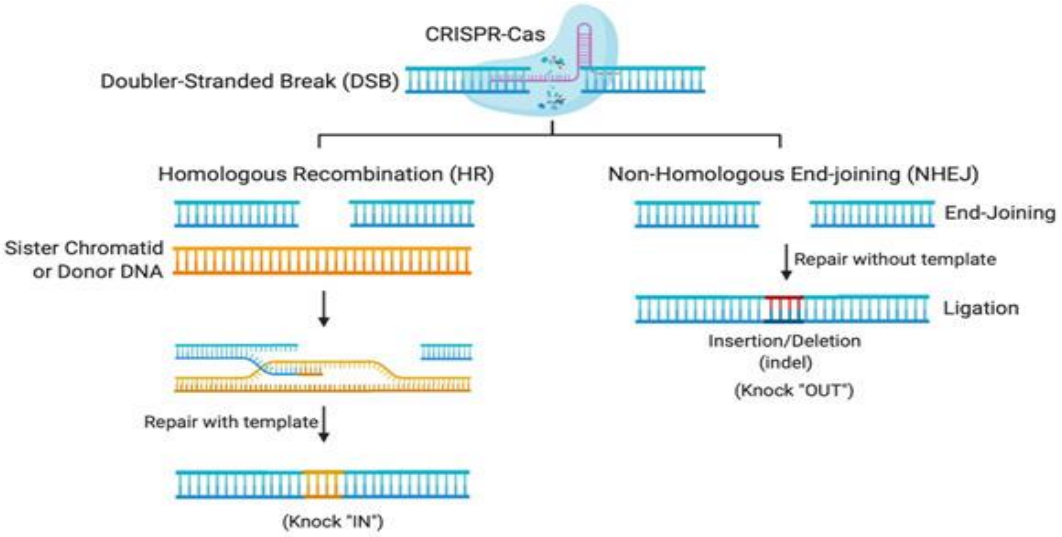


Figura 11: A edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas depende de vias de reparo de DNA. Quebras de fita dupla (DSBs) de DNA são reparadas nas células por meio da junção de extremidades não homólogas (NHEJ), propensa a erros, ou da recombinação homóloga (HR) sem erros, a forma mais comum de reparo direcionado por homologia (HDR). O reparo de DSB por meio de NHEJ cria pequenas inserções ou deleções (indels), enquanto a HDR requer um molde de reparo, que pode ser uma cromátide-irmã, outra região homóloga ou um doador de reparo exógeno. *Fonte: Shalaby et al., 2020.*

Os oligonucleotídeos de fita simples (*single-stranded oligodeoxynucleotides*, ssODNs) são moléculas sintéticas de DNA de fita simples, projetadas para atuar como moldes durante o reparo homólogo do DNA, especialmente em correções de mutações pontuais ou inserções precisas de pequenas sequências (Yoshimi et al., 2016). Por exemplo, Paquet e colaboradores (2016) utilizaram ssODNs para corrigir mutações patogênicas em células-tronco pluripotentes humanas, alcançando taxas de *knock-in* de até 30% em *loci* específicos. Richardson et al. (2016) demonstraram que o posicionamento da quebra em relação ao ssODN influencia diretamente a eficiência de edição, sendo que designs com homologia otimizada aumentaram significativamente as taxas de integração precisa. Além disso, estudos de Liu et al. (2019) empregaram ssODNs para a inserção de epítopos de marcação em genes endógenos de células humanas, permitindo análise funcional de proteínas sem alterar sua expressão natural. Outro exemplo é o trabalho de Zhang et al. (2017), que combinou ssODNs com Cas9 nickase para reduzir cortes fora do alvo ao introduzir mutações pontuais em células de mamíferos, obtendo eficiências superiores às obtidas com plasmídeos homólogos tradicionais. Em modelos de camundongos, ssODNs também têm sido utilizados para a correção de mutações germinativas, como demonstrado por Quadros et al. (2017), permitindo a geração de animais transgênicos com precisão e menor incidência de *indels*.

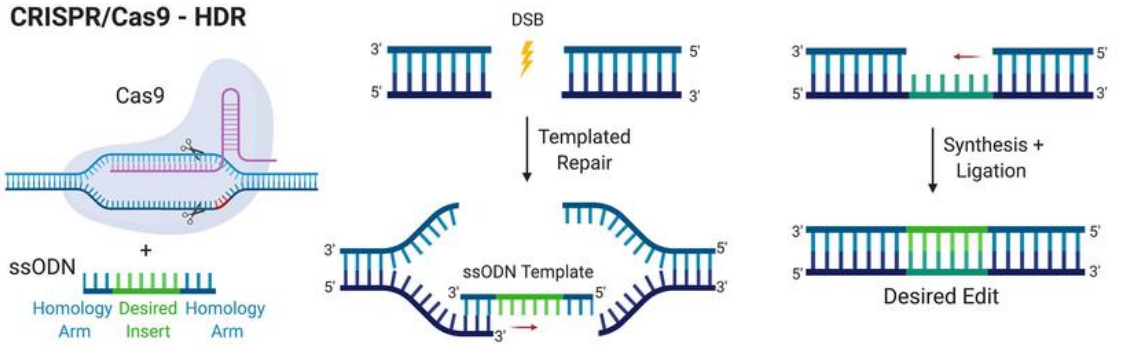


Figura 12: Uso de ssODN como molde de reparo na edição gênica por CRISPR/Cas9. A endonuclease Cas9 induz uma quebra de fita dupla (DSB) no DNA alvo. Um oligonucleotídeo de fita simples exógeno (**ssODN**) contendo as sequências correspondentes aos braços de homologia e à região de edição desejada é utilizado como molde de reparo, permitindo a correção ou inserção precisa de sequências via recombinação homóloga (HDR). *Fonte: Adaptado de Uddin* et al.*, 2020.*

Nos últimos anos, diversas aplicações da tecnologia CRISPR demonstraram sua versatilidade no desenvolvimento de proteínas recombinantes, tanto por meio de estratégias de *knockout* quanto *knock-in*. Um exemplo relevante é o uso de CRISPR-Cas9 para o *knockout* do gene FUT8 (fucosiltransferase 8) em células CHO, visando reduzir a fucosilação central em anticorpos monoclonais. Essa modificação aumenta a atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), resultando em biofármacos com maior eficácia terapêutica (Sun et al., 2015). Esse tipo de edição baseia-se majoritariamente em NHEJ, uma vez que a simples interrupção do gene já garante o fenótipo desejado. Em contraste, aplicações voltadas para a introdução de novos genes frequentemente dependem de HDR associado a moldes do tipo ssODN ou plasmídeos homólogos. Por exemplo, Shin et al. (2020) demonstraram a inserção precisa de uma construção codificante para proteína fluorescente GFP no locus AAVS1 de células HEK293, utilizando HDR mediado por CRISPR. Embora seja um modelo de prova de conceito, este estudo evidenciou que a tecnologia permite *knock-in* de transgenes funcionais em locais seguros, minimizando riscos de mutagênese insercional.

No âmbito da produção de biofármacos, a utilização de estratégias baseadas em CRISPR-Cas9 tem possibilitado a integração direcionada de construções complexas diretamente no genoma de células hospedeiras, favorecendo a expressão estável e previsível de proteínas recombinantes. Um exemplo notável é o estudo de Zhou et al. (2019), no qual os autores realizaram a inserção sítio-específica dos genes das cadeias leve e pesada de um anticorpo monoclonal no genoma de células CHO-K1, utilizando reparo por recombinação homóloga (HDR) mediado por CRISPR. A integração foi conduzida em um *hotspot* genômico estável previamente identificado, resultando em linhagens com alta estabilidade de expressão e níveis reprodutíveis de produção ao longo

de múltiplas passagens celulares. Outros estudos exploraram sistemas alternativos de expressão em células não tradicionais. Por exemplo, Jeong et al. (2016) utilizaram CRISPR-Cas9 para inserir o gene que codifica o fator de crescimento de fibroblastos humano 2 (FGF2) no locus da β-caseína em fibroblastos bovinos, que posteriormente foram utilizados para gerar blastocistos transgênicos. A escolha do FGF2 humano, uma proteína de interesse biotecnológico com funções bem caracterizadas em crescimento e regeneração celular, permitiu avaliar a eficiência do *knock-in* em um *locus* seguro e específico para expressão na glândula mamária. Uma abordagem semelhante foi aplicada em pequenos ruminantes, em que o gene da defensina humana HNP1 (human neutrophil peptide 1) foi inserido no exon 7 do gene β-caseína (CSN2) de cabras por meio da tecnologia CRISPR/Cas9 associada à recombinação homóloga (HDR). O transgene foi colocado sob o controle do promotor endógeno da β-caseína, resultando na expressão e secreção da HNP1 no leite das cabras transgênicas, sem efeitos adversos à lactação ou à saúde dos animais, demonstrando o potencial da glândula mamária como biorreator para produção de peptídeos antimicrobianos humanos (Li et al., 2024).

A escolha criteriosa do sítio genômico de inserção é um fator determinante para o sucesso da engenharia genética voltada à produção de biofármacos. O silenciamento de transgenes constitui um importante desafio em diversas aplicações de biotecnologia baseadas em células de mamíferos. Em linhagens industriais amplamente utilizadas, como células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de rim embrionário humano (HEK293), a ativação parcial ou completa de transgenes integrados pode reduzir significativamente o rendimento de produção ao longo do tempo, comprometendo a fabricação de biofármacos de maneira estável e previsível (Cabrera et al., 2022). Nesse contexto, ganha destaque o conceito de *safe harbor loci*, regiões genômicas que permitem a integração de transgenes de maneira previsível, sem comprometer genes essenciais e garantindo expressão estável e sustentada ao longo do tempo. Diversos *loci* têm sido caracterizados como *safe harbors* em organismos distintos. No genoma humano, o AAVS1 (PPP1R12C *locus*) e o CCR5 são amplamente explorados para inserção de transgenes funcionais em células-tronco e em células humanas imortalizadas (Shin et al., 2020). Em camundongos, o *locus* ROSA26, identificado originalmente em 1991, consolidou-se como a principal região de inserção para geração de modelos transgênicos, permitindo expressão ubíqua e estável de genes exógenos (Chu et al., 2016). Outros exemplos incluem o locus Hipp11 em camundongos e o H11 em células humanas, também reconhecidos como regiões seguras para integração de construções maiores e expressão controlada de proteínas recombinantes (Browning et al., 2020; Yu et al., 2024).

No genoma bovino, o locus bRosa26 (ou cRosa26) foi caracterizado como homólogo funcional ao murino e tem sido empregado com sucesso em experimentos de *knock-in*. Um estudo pioneiro utilizando TALENs demonstrou a integração de *EGFP* no locus bRosa26 em fibroblastos fetais bovinos, embriões, fetos e animais adultos, com expressão ubíqua e estável em diferentes tecidos, validando-o como um alvo confiável para inserções de maior porte (Wang et al., 2018). Posteriormente, avanços com CRISPR/Cas9 confirmaram a utilidade do cRosa26, permitindo a inserção de vetores contendo *EGFP* sob diferentes promotores (CAG, EF1α, PGK, além do promotor endógeno do próprio Rosa26). Os resultados mostraram expressão estável em células bovinas e revelaram que o promotor CAG conferiu maior nível de expressão, reforçando a versatilidade do *locus* como plataforma para expressão de transgenes em sistemas de produção (Xie et al., 2022).

A importância do Rosa26 não se limita aos bovinos e murinos. Em ovinos, por exemplo, o *locus* sRosa26 foi explorado para a inserção do *tGFP* via CRISPR/Cas9, demonstrando alta eficiência de *knock-in* e expressão estável do marcador fluorescente, o que confirma a conservação funcional deste *safe harbor* em diferentes espécies de mamíferos (Wu et al., 2016). Esses resultados evidenciam que o Rosa26 constitui um alvo genômico robusto para integração de construções genéticas complexas, incluindo não apenas marcadores fluorescentes, mas também genes de interesse para biomedicina e biotecnologia.

Embora a escolha de um *safe harbor* como o Rosa26 seja determinante para assegurar a estabilidade e previsibilidade da inserção, o nível e a especificidade da expressão do transgene dependem fortemente do promotor associado (Chen et al., 2011). Em sistemas de produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos, diferentes promotores têm sido explorados, variando desde promotores constitutivos, como CMV e EF1α, até promotores tecido-específicos que conferem maior controle e direcionamento da expressão (Norrman et al., 2010). Um exemplo particularmente relevante para aplicações em bovinos é o promotor da β-lactoglobulina (BLG), principal proteína do soro do leite, cuja atividade é restrita às células epiteliais da glândula mamária. Esse promotor pode ser utilizado em estratégias de biotecnologia animal para direcionar a expressão de proteínas recombinantes ao leite, permitindo não apenas altos rendimentos de secreção, mas também uma via prática e economicamente viável de purificação (Zhang et al., 2022).

No contexto da fibronectina recombinante, a utilização do promotor da BLG em células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) representaria uma estratégia inovadora para produzir e secretar isoformas específicas, como V0 e V89, diretamente no leite. Essa abordagem permitiria explorar as vantagens do sistema de expressão mamário,

incluindo a correta glicosilação e dobramento proteico, ao mesmo tempo em que possibilitaria a obtenção de grandes quantidades de proteína funcional. Além disso, ao associar a inserção do gene da fibronectina em um *safe harbor* como o Rosa26 ao uso de um promotor tecido-específico, seria possível combinar estabilidade genômica com expressão direcionada, criando uma plataforma de produção otimizada para biofármacos de interesse translacional.

1.5 Lipofecção: uma ferramenta eficiente e versátil na transfecção celular

A lipofecção é um método de transfecção não viral amplamente empregado para introduzir ácidos nucleicos em células de mamíferos, baseado na utilização de lipídios catiônicos capazes de formar complexos com DNA ou RNA e facilitar sua entrada nas células (Kumar et al., 2019). Esses lipídios se auto-organizam em vesículas denominadas lipossomas, que interagem com a membrana plasmática por meio de fusão ou endocitose, promovendo a liberação do material genético no citoplasma. A partir daí, o DNA pode alcançar o núcleo celular, onde ocorre a integração e expressão do transgene (Pavlov et al., 2024). Trata-se, portanto, de uma técnica de alta versatilidade, de aplicação relativamente simples e que dispensa o uso de vetores virais, reduzindo riscos imunogênicos e biológicos (Wang et al., 2023).

O conceito de lipofecção foi introduzido no final da década de 1980, quando Felgner e colaboradores demonstraram pela primeira vez a eficiência de lipídios catiônicos sintéticos para promover a entrada de DNA plasmidial em células eucarióticas (Felgner et al., 1987). Desde então, uma ampla gama de reagentes lipídicos foi desenvolvida, como DOTAP, DOPE e as formulações comerciais da série Lipofectamine®, que apresentam diferentes graus de eficiência e toxicidade. Esses avanços tornaram a lipofecção um dos métodos de transfecção mais populares em laboratórios de biologia molecular e engenharia celular, tanto para expressão transitória quanto para geração de linhagens estáveis (Zhi et al., 2009; Fus-Kujawa et al., 2021).

A lipofecção tem se destacado por sua ampla aplicabilidade na biotecnologia e na biomedicina. Em pesquisa básica, é amplamente utilizada para a introdução de plasmídeos de expressão contendo genes de interesse ou RNA mensageiro (mRNA), permitindo análises de expressão transitória, regulação gênica e produção de proteínas recombinantes em diversos tipos celulares (Wang et al., 2023). Em aplicações terapêuticas, a lipofecção é empregada como alternativa não viral para a entrega de ácidos nucleicos em células humanas e animais, incluindo o uso de nanopartículas lipídicas derivadas desse princípio em vacinas de mRNA, como as desenvolvidas contra a COVID-19 pela Pfizer-BioNTech

e Moderna, que utilizam sistemas de encapsulamento lipídico para proteger e transportar o mRNA vacinal até o citoplasma celular (Hou et al., 2021). Além disso, formulações lipídicas têm sido empregadas em terapias gênicas experimentais. Por exemplo, nanopartículas lipídicas (LNPs) carregando mRNA de VEGF-A mostraram promover regeneração de tecidos isquêmicos, como na cicatrização de feridas diabéticas, e induzir angiogênese *in vitro* e *in vivo* (Nawaz et al., 2023). Revisões recentes também descrevem a aplicação de LNP-mRNA para doenças cardiovasculares e hipercolesterolemia, destacando as vantagens de entrega não viral, expressões controladas e menor risco de efeitos adversos (Soroudi et al., 2024). Além disso, sua aplicação expandiu-se para a edição gênica baseada em CRISPR/Cas9, permitindo a introdução eficiente de plasmídeos codificantes e ribonucleoproteínas (RNPs), possibilitando a modificação precisa do genoma de células de mamíferos de forma não viral (Kazemian et al., 2022).

Comparada a outros métodos de transfecção, a lipofecção apresenta vantagens e limitações específicas, que se tornam evidentes quando confrontadas com abordagens físicas ou virais. Entre essas, destaca-se a microinjeção, que consiste na introdução direta do DNA, RNA ou ribonucleoproteína (RNP) no núcleo ou citoplasma por meio de agulhas micrométricas, o que confere elevado controle sobre a célula individual e alta precisão na entrega, porém é um processo laborioso, de baixa escalabilidade e dependente de equipamentos especializados e alta habilidade técnica (Xu et al., 2018). Já a eletroporação baseia-se na aplicação de pulsos elétricos que permeabilizam temporariamente a membrana plasmática, permitindo a entrada de ácidos nucleicos e proteínas. Esse método é particularmente eficaz para células de difícil transfecção, como linfócitos e células-tronco, mas pode causar elevada mortalidade celular e requer otimização cuidadosa de parâmetros elétricos e condições de meio (Potter & Heller, 2018). Entre os métodos químicos, destaca-se também o uso da polietilenimina (PEI), um polímero catiônico capaz de formar complexos com DNA ou RNA e promover sua internalização celular por endocitose. A PEI apresenta boa eficiência e baixo custo, sendo amplamente utilizada na produção de proteínas recombinantes em células como as de ovário de hamster chinês (CHO), embora sua toxicidade e dependência da otimização da razão N/P (nitrogênio/fósforo) possam limitar sua aplicação em certos sistemas (Elshereef et al., 2019). Em comparação aos vetores virais, que utilizam vírus modificados (como lentivírus, adenovírus ou AAV) para integrar ou expressar transgenes com alta eficiência, a lipofecção apresenta menor taxa de integração estável, mas se destaca por eliminar o risco de resposta imunológica e a complexidade envolvida na produção e purificação de partículas virais (Ramamoorth & Narvekar, 2015). Ademais, nanopartículas poliméricas

e sistemas híbridos lipopoliméricos têm surgido como alternativas promissoras, oferecendo maior estabilidade e direcionamento específico, embora ainda enfrentem desafios de padronização e citotoxicidade variável (Vlasova et al., 2025).

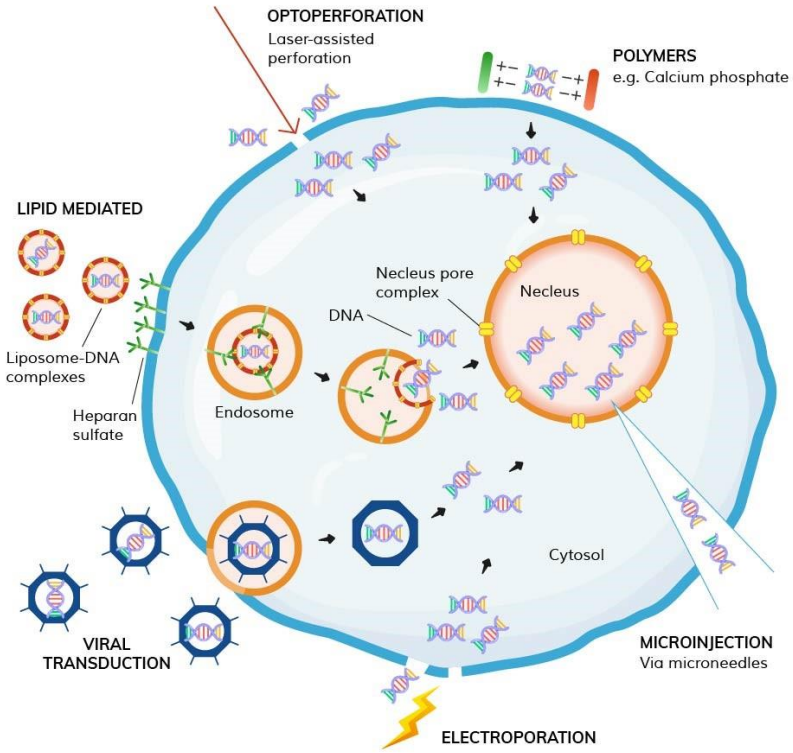


Figura 13: Estratégias de entrega de ácidos nucleicos em células eucarióticas. Diferentes abordagens podem ser utilizadas para introdução de DNA ou RNA no interior celular, incluindo métodos físicos (eletroporação, microinjeção, optoperfuração), químicos (lipofecção mediada por lipossomos, polímeros como fosfato de cálcio) e biológicos (transdução viral). Após a entrada no citoplasma, os complexos genéticos podem ser internalizados por endocitose e transportados ao núcleo, onde ocorre a expressão do transgene.

A eficiência da lipofecção é influenciada por diversos fatores físico-químicos e biológicos. Entre eles destacam-se o tipo celular, a proporção entre lipídio e ácido nucleico, o tamanho e a topologia do vetor (plasmídeo, mRNA ou RNP), o tempo de incubação, e as condições do meio de cultura, incluindo a presença de soro e antifúngicos/antibióticos e a densidade celular. Tais parâmetros afetam não apenas a taxa de transfecção, mas também a viabilidade celular, sendo comum a otimização empírica de protocolos para cada tipo de célula e vetor (Ma et al., 2007; Kong et al., 2024;).

Em sistemas de produção de proteínas recombinantes, a lipofecção tem se mostrado uma ferramenta eficaz para a entrega de vetores de expressão contendo sequências codificantes de interesse sob controle de promotores constitutivos, induzíveis ou tecido-específicos (Chong et al., 2021). Essa abordagem é particularmente relevante para a

expressão transitória em células de mamíferos e para a etapa inicial da geração de linhagens geneticamente modificadas antes da integração estável. Em aplicações mais específicas, como a transfecção de células epiteliais da glândula mamária bovina, a lipofecção permitiria a entrega de vetores CRISPR/Cas9 e moldes HDR para a inserção de genes de interesse sob controle de promotores como o da β-lactoglobulina (BLG), direcionando a secreção de proteínas recombinantes no leite ou no meio de cultura.

Nos últimos anos, esforços têm sido direcionados ao aprimoramento dos sistemas lipídicos de entrega gênica. Lipossomas de nova geração, compostos por lipídios biodegradáveis, nanopartículas híbridas lipídio-polímero e formulações sensíveis a estímulos (pH, temperatura ou carga) têm demonstrado ganhos significativos em eficiência e biocompatibilidade. Essas inovações ampliam o potencial da lipofecção não apenas como ferramenta de pesquisa, mas também como plataforma segura e escalável para aplicações clínicas e de engenharia genética avançada (Mehta et al., 2023).

JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de protocolos de transfecção celular utilizando a tecnologia CRISPR-Cas9 em células bovinas é uma abordagem inovadora para a produção de proteínas recombinantes, como a fibronectina, essencial na medicina regenerativa. A fibronectina desempenha papéis cruciais na adesão, migração e proliferação celular, sendo usada na produção de cola de fibrina, um selante biológico aplicado em terapias para reconstrução tecidual. A utilização de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) como possíveis biorreatores representa uma abordagem promissora para a produção de proteínas recombinantes de interesse biomédico. Considerando a capacidade dessas células de realizar modificações pós-traducionais complexas, levanta-se a hipótese de que possam contribuir para a obtenção de fibronectina recombinante com adequada funcionalidade biológica. Nesse contexto, a aplicação da tecnologia CRISPR-Cas9, associada ao uso de oligonucleotídeos de fita simples (ssODNs), pode representar uma estratégia capaz de favorecer maior precisão na edição gênica. Adicionalmente, a utilização de bMECs como sistema celular pode constituir uma alternativa experimental à geração de animais transgênicos, contribuindo para a redução de tempo e custos associados a esses modelos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar a estratégia de edição gênica baseada no sistema CRISPR-Cas9 otimizado com oligonucleotídeos de fita simples (ssODNs) para a inserção e expressão estável das isoformas V0 e V89 da fibronectina humana recombinante em células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs), consolidando-as como um modelo *in vitro* para a produção de biofármacos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Implementar e aprimorar protocolos para o estabelecimento e manutenção de bMECs, utilizando matriz extracelular Geltrex™ como substrato para favorecer a adesão, viabilidade e diferenciação celular.

2.2.2 Utilizar oligonucleotídeos de fita simples (ssODNs) como estratégia para aumentar a especificidade da edição gênica mediada pela Cas9D10A nickase, bem como atuar como molde para o reparo por recombinação homóloga (HDR), visando à inserção precisa das isoformas V0/V89 da fibronectina humana no genoma das bMECs.

2.2.3 Transfectar bMECs com o complexo de edição gênica CRISPR-Cas9D10A nickase, sgRNAs, ssODNs e os plasmídeos recombinantes pFN1-V0 e pFN1-V89, utilizando lipofecção mediada por Lipofectamina CRISPRMAX.

2.2.4 Isolar e expandir bMECs editadas por CRISPR-Cas9 a fim de obter colônias transgênicas monoclonais, utilizando diluição limitante em placas de 96 poços.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

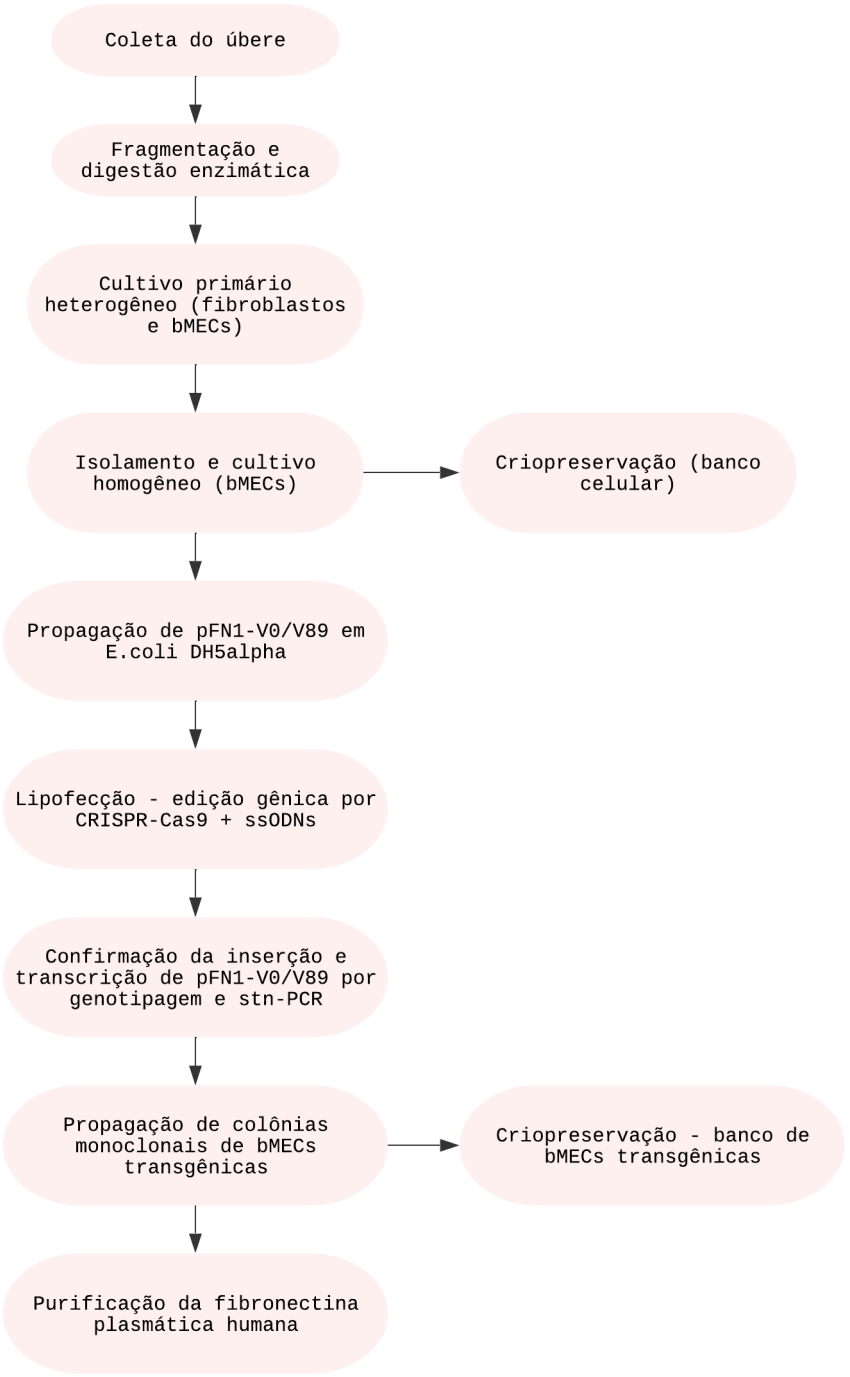


Figura 14: Esquema do delineamento experimental adotado para o estabelecimento da cultura de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs), edição gênica via CRISPR-Cas9 nickase com o plasmídeo pFN1-V0/V89, análises moleculares, isolamento clonal e aplicação como biorreator celular para produção de fibronectina recombinante humana.

3.2 Desenho de vetores, sgRNAs e construção da sequência do transgene pFN1-V0/V89

As sequências dos loci alvo analisados neste estudo foram obtidas a partir do

genoma de referência de *Bos taurus* (bosTau9), na versão ARS-UCD2.0, disponível no UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu). O desenho dos RNAs guias (sgRNAs) foi realizado com o auxílio das ferramentas bioinformáticas CHOPCHOP v3 e CRISPOR, selecionando-se aqueles que apresentaram os melhores escores preditivos para diferentes estratégias de *knock-in* gênico. O planejamento dos sgRNAs considerou o uso da enzima Cas9D10A (nickase) e teve como alvos dois loci específicos do genoma bovino: *ROSA26* e *beta-lactoglobulina* (BLG). Os pares de oligonucleotídeos de fita simples (ssODNs), utilizados como moldes para reparo direcionado, foram sintetizados comercialmente pela empresa GenScript.

O desenho dos vetores doadores contendo as sequências da fibronectina humana recombinante (pFN1-V0 e pFN1-V89) foi conduzido utilizando o *software* UGENE, com base nas sequências de referência disponíveis no UCSC Genome Browser, as quais se fundamentam em dados previamente descritos na literatura. Os vetores foram projetados para contemplar as isoformas de splicing alternativo V0 e V89 do gene humano *FN1*, incorporando regiões homólogas flanqueadoras (braços 5' e 3') correspondentes aos sítios alvo no genoma bovino (ROSA26 e BLG). Além disso, foram inseridos sítios de restrição específicos no interior desses braços homólogos, permitindo a distinção entre os vetores pFN1-V0 e pFN1-V89 e facilitando a genotipagem das amostras geneticamente modificadas. A síntese dos vetores recombinantes foi realizada sob encomenda pela empresa GenScript (https://www.genscript.com/).

3.3 Design dos *primers* para genotipagem

Os *primers* para genotipagem das regiões de *ROSA26* e *BLG*, bem como para a análise dos transcritos das isoformas pFN1-V0/V89, foram projetados com base no genoma de referência bovino bosTau7, obtido no UCSC Genome Browser. O desenho foi realizado com o software GeneRunner versão 3.05 (https://gene-runner.software.informer.com/).

Os *primers* projetados estão listado na Tabela 2

Região	Sequência primers	Amplicon (pb)
	Análise de Transcrito	
pFN1-V0	F: 5'-GGGTCTCCTCCCAGAGAAGT-3' R: 5'-GGAAAAAGACAGGACAAGAAGC-3'	164
pFN1-V89	F: 5'-TTCCACACCCCAATCTTCAT-3' R: 5'-CTTCTGGTCAGCAACCCAGT-3'	135
	Genotipagem	
BLG-ROSA26 (3'ARM)	F: 5'-GGAAGTGGAAAATGGCTGTC-3' R: 5'-CTGAACCTCACGTCCGGTTC-3'	1.015

Tabela 2. Regiões para análise de transcrição e genotipagem pós-edição gênica via CRISPR-Cas9 em células bovinas. Sequências de *primers* e tamanhos dos amplicons utilizados na análise da expressão gênica e genotipagem de células bovinas após o protocolo de transfecção.

3.4 Transformação bacteriana das isoformas do plasmídeo pFN1-V0/V89

Para a transformação bacteriana, foram utilizados 100 µL de células competentes de *Escherichia coli* DH5α, as quais foram descongeladas a partir de –70 °C e mantidas em gelo. Em seguida, adicionaram-se 1 µL dos plasmídeos pFN1-V0 ou pFN1-V89 (500 ng). A solução contendo bactérias e plasmídeos foi submetida ao processo de transformação por choque térmico, permanecendo inicialmente em gelo por 30 minutos, seguida de incubação a 42 °C por 90 segundos e, posteriormente, retorno ao gelo por 2 minutos.

Após o choque térmico, foram adicionados 250 µL de meio LB líquido à suspensão bacteriana, a qual foi incubada por 1 hora a 37 °C sob agitação constante a 250 rpm, a fim de permitir a recuperação celular e a expressão do gene de resistência à ampicilina. Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso para posterior plaqueamento em meio LB sólido suplementado com ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas para o crescimento das colônias bacterianas.

As colônias resultantes foram selecionadas e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da transformação. Após a identificação das colônias positivas, estas foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas por 18 horas a 37 °C sob agitação a 250 rpm. Em seguida, as culturas bacterianas foram centrifugadas, e o pelete obtido foi utilizado para a extração do DNA plasmidial empregando o kit PureYield Plasmid Miniprep System, conforme as instruções do fabricante.

3.5 Cultivo de células epiteliais da glândula mamária

O cultivo de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) foi realizado a partir de amostras de tecido mamário coletadas do úbere de vacas (Figura 4), obtidas em um matadouro localizado no município de Campos dos Goytacazes, Brasil. Aproximadamente 7 a 10 g de tecido foram submetidos a sucessivas lavagens em solução salina tamponada (PBS 1×) suplementada com ciprofloxacino (10 µL/mL), com o objetivo de remover resíduos sanguíneos e reduzir a carga microbiana (Figura 4A).

Em seguida, o tecido foi fragmentado e submetido à digestão enzimática em solução contendo meio DMEM/F12 suplementado com HEPES, 2% de soro fetal bovino (SFB), colagenase (320 U/mL) e hialuronidase (100 U/mL), sob agitação constante por 1 hora, conforme descrito por Martignani et al. (2018). Previamente à distribuição dos explantes, as placas de cultivo de seis poços foram tratadas com matriz extracelular Geltrex™ (Gibco), utilizando 1,5 mL por poço, conforme as recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C para permitir a polimerização da matriz sobre o substrato. Após esse período, o excesso de Geltrex™ foi removido e, então, os fragmentos de tecido, com aproximadamente 1 mm^3, foram distribuídos em grupos de cinco a seis explantes por poço (Figura 4B).

As placas foram mantidas sob placa aquecedora a 37 °C para favorecer a desidratação parcial e a aderência dos explantes ao substrato. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de meio DMEM/F12 sem HEPES (Gibco) previamente filtrado e suplementado com 2ml de SFB (10%), 200ul de ciprofloxacino (10 µL/mL), 200ul de solução antibiótico-antifúngica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10 mg/mL e anfotericina B 25 µg/mL) e 400ul de nistatina (20 µL/mL; 50 mg). As culturas foram então incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2.

Os explantes foram monitorados a cada 48 horas para avaliação da aderência tecidual ao substrato, do desprendimento celular a partir dos explantes e da posterior adesão das células à matriz, sendo realizada, concomitantemente, a troca do meio de cultivo. Após sete dias, os explantes foram removidos e a confluência das células aderidas ao substrato avaliada, conforme ilustrado nas Figuras 4C e 4D. Quando a confluência celular atingiu valores superiores a 70%, as culturas foram submetidas à dissociação enzimática por tripsinização, com a finalidade de promover o isolamento e enriquecimento da população de bMECs em relação a outros tipos celulares concomitantemente presentes no cultivo, como fibroblastos.

Inicialmente, o meio de cultivo foi removido, e os poços foram lavados com 2 mL

de solução de PBS 1× suplementada com ciprofloxacino, preparada na proporção de 10 µL/mL (120 µL de ciprofloxacino diluídos em 11,88 mL de PBS, totalizando 12 mL). Em seguida, a solução de lavagem foi removida, e foram adicionados 1,5 mL por poço de solução de tripsina-EDTA. As placas foram incubadas sob placa aquecedora a 37 °C por 3 minutos, promovendo a dissociação preferencial dos fibroblastos, os quais apresentam maior suscetibilidade à ação enzimática da tripsina. Após esse período, o sobrenadante, enriquecido predominantemente por fibroblastos, foi cuidadosamente aspirado, armazenado e criopreservado para estudos futuros.

Posteriormente, foram adicionados novamente 1,5 mL por poço de solução de tripsina-EDTA, e as placas foram incubadas a 37 °C por 10 minutos adicionais, permitindo a dissociação das bMECs aderidas ao substrato. Após a incubação, a suspensão celular de cada poço foi coletada e transferida para tubos de 2 mL contendo 200 µL de soro fetal bovino (SFB), com o objetivo de inativar a atividade proteolítica da tripsina. Os tubos foram então submetidos à centrifugação por 4 minutos a 10.000 rpm. Após a formação do pellet celular, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, e os pellets foram ressuspendidos no volume residual aproximado de 100 µL presente no tubo. As células ressuspendidas foram, então, redistribuídas e fracionadas em duas novas placas de cultivo de seis poços, previamente tratadas com matriz extracelular Geltrex™ (Gibco), visando à continuidade do cultivo e o enriquecimento da população de bMECs.

3.6 Transfecção celular por lipofectamina CRISPRMAX

A transfecção foi realizada em células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs), semeadas na densidade de 4×10^5 células/mL em placas de 6 poços, utilizando Lipofectamine™ CRISPRMAX™ (Thermo Fisher Scientific), conforme protocolo adaptado do fabricante. Para cada poço, foram preparados dois tubos de reação distintos.

No tubo 1, destinado à formação do complexo ribonucleoproteico (RNP) e associação com os componentes de edição gênica, foram adicionados 84,5 µL de Opti-MEM™ Reduced Serum Medium, 2 µL de Cas9 D10A nickase (6,25 µg), 1 µL (1,2 µg) de cada sgRNA, totalizando dois pares de sgRNAs, 1 µL (1,2 µg) de cada ssODN, correspondendo a um par de doadores, 12,5 µL de Cas9 Plus™ Reagent e 10 µL (1 µg) de cada isoforma do plasmídeo pFN1-V0/V89. Esse preparo foi realizado individualmente por poço, sendo a lipofecção conduzida em quatro poços experimentais, além de dois poços controle. Após a homogeneização, o tubo 1 foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a formação do complexo RNP.

Paralelamente, no tubo 2, foram adicionados 117,5 µL de Opti-MEM™ por poço,

permanecendo sem adição do reagente de transfecção durante o período inicial de incubação do tubo 1. Ao término dos 5 minutos de incubação do tubo 1, foram adicionados 7,5 µL de Lipofectamine™ CRISPRMAX™ ao tubo 2, seguido imediatamente da transferência do conteúdo do tubo 1 para o tubo 2, com homogeneização suave. O volume final da solução resultante foi de 250 µL por poço.

Antes da adição do complexo de transfecção, o meio de cultivo de todos os poços foi substituído por DMEM sem HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após a formação do complexo final, a solução foi adicionada aos poços correspondentes em até 10 minutos, respeitando o tempo máximo recomendado para garantir a eficiência da lipofecção.

As células foram então incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. Após 48 horas, o meio de cultivo foi substituído, e as células foram mantidas em cultivo até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Em seguida, as bMECs foram coletadas por tripsinização e destinadas à análise da incorporação do transgene por *single-tube nested* PCR (ST-nPCR).

3.7 Isolamento de colônias transgênicas

Após o protocolo de transfecção celular, tanto o cultivo lipofectado quanto o controle não lipofectado foram submetidos à tripsinização para a coleta das células, destinadas à análise da incorporação gênica, bem como ao isolamento de colônias de células bMEC-pFN1-V0/V89^{+}. O isolamento clonal foi realizado conforme o protocolo descrito por Ryan, J. (Corning®), ilustrado na Figura 5.

Previamente ao isolamento, placas de 96 poços foram preparadas com matriz extracelular Geltrex™. Para esse preparo, foram utilizados 9 mg de Geltrex™, sendo aplicados aproximadamente 20 µL por poço, de modo a recobrir uniformemente o fundo e formar uma camada de suporte para adesão celular.

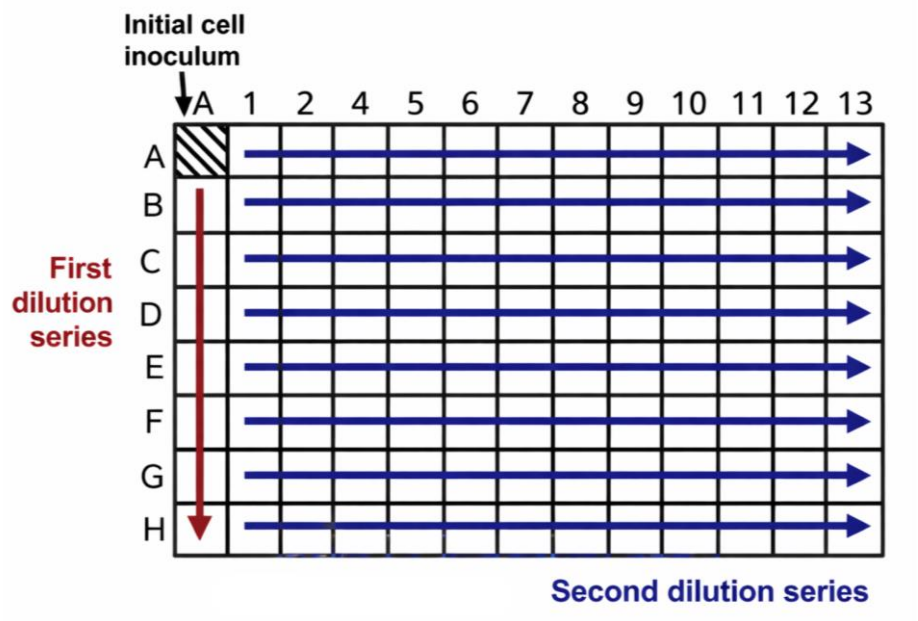


Figura 15. Esquema de diluição limitante para isolamento de colônias celulares. Representação do procedimento de diluição limitante em placa, partindo de um inóculo celular inicial (A1), seguido por uma primeira série de diluições verticais e uma segunda série de diluições horizontais. Essa estratégia permite a redução progressiva da densidade celular, favorecendo a obtenção de poços contendo células isoladas e o posterior estabelecimento de colônias monoclonais.

Para o procedimento de isolamento, as células foram ajustadas à concentração final de 2×10^4 células/mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL de meio DMEM/F12 sem HEPES em cada poço, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), glutamina, piruvato, ciprofloxacina (10 µL/mL), solução de antibiótico-antimicótico (penicilina/anfotericina B; 10 µL/mL) e nistatina (2 µL/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2, por um período de 5 a 10 dias, durante o qual o crescimento das colônias foi monitorado periodicamente. Ao término do período de incubação e crescimento das colônias, os poços contendo colônias isoladas foram selecionados para expansão. As células foram coletadas por tripsinização, seguida de neutralização da enzima com soro fetal bovino. Em seguida, as células foram centrifugadas, e o pelete celular obtido foi destinado à extração de DNA genômico.

DNA extraído foi utilizado para análises de genotipagem molecular, com o objetivo de confirmar a correta incorporação do inserto pFN1-V0/V89 no genoma das células bMECs.

3.8 Análise da incorporação do transgene

3.8.1 Extração de DNA e genotipagem

As amostras de DNA genômico das células coletadas após o protocolo de diluição limitante foram extraídas utilizando um protocolo modificado descrito por Olerup e Zetterquist (1992). Inicialmente, as células foram centrifugadas para formação do pellet celular, e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, foram adicionados 80 µL de tampão de proteinase K (0,375 M NaCl; 0,12 M EDTA), 280 µL de água Milli-Q, 10 µL de SDS a 20% e 8 µL de proteinase K (25 mg/mL). As amostras foram incubadas a 55 °C por 4 horas para promover a digestão proteica completa.

Após a digestão, os tubos foram mantidos a 4 °C por 15 minutos, e posteriormente foram adicionados 120 µL de NaCl 5 M. As amostras foram homogeneizadas por inversão suave (3 a 5 vezes) e centrifugadas a 20.000 × g por 10 minutos. A fase aquosa resultante (aproximadamente 400 µL) foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo estéril, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado para precipitação do DNA. O material foi centrifugado novamente a 20.000 × g por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão.

Em seguida, o pellet de DNA foi lavado com 1 mL de etanol a 70% e centrifugado a 20.000 × g por mais 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o material foi deixado para secar à temperatura ambiente sobre papel filtro por aproximadamente 30 minutos. Por fim, o DNA foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura previamente aquecida a 37 °C, permanecendo nessa condição por 1 hora para completa solubilização.

Para a genotipagem das amostras, foi realizada uma ST-nPCR (Single-Tube Nested PCR), utilizando aproximadamente 10 ng de DNA genômico para a amplificação da região BLG–ROSA26 (Tabela 1). A reação foi conduzida em três etapas. Na primeira etapa, os *primers* internos (0,5 µM) foram previamente adicionados às tampas dos microtubos e submetidos à secagem em termociclador a 37 °C por 30 minutos. Na sequência, foi preparado o mix de reação contendo os primers externos, totalizando um volume final de 20 µL, composto por: 4 µL de tampão 10×, 0,2 µM de cada primer externo (sense e antisense), 100 µM de dNTPs, 0,2 µL de Taq DNA polimerase Phusion (Uniscience), 2 µL de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume final. As condições de amplificação da primeira PCR foram: desnaturação inicial a 98 °C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 98 °C por 10 segundos, temperatura de anelamento (Tm) específica por 15 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com extensão final a 98 °C por 1 minuto. Após a conclusão da primeira PCR, os microtubos foram homogeneizados por inversão para permitir a incorporação dos *primers* internos à reação e, em seguida, centrifugados por 1 minuto a 6.000 × g. A segunda etapa da PCR foi então realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 98 °C por 2 minutos, seguida

de 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, temperatura de anelamento (Tm) por 15 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Unisafe™ (Uniscience), e visualizados sob luz ultravioleta para confirmação da presença do fragmento esperado.

3.8.2 RT-PCR e análise de transcritos

A extração de RNA total das células lipofectadas e do grupo controle foi realizada utilizando o reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra, foram adicionados 1 mL de TRIzol™, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente para completa lise celular. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, e as amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 10.000 × g por 15 minutos, visando à separação das fases.

Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA (aproximadamente 400 µL) foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Para a precipitação do RNA, foi adicionado 1 mL de isopropanol, seguido de centrifugação a 10.000 × g por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado, e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, sendo novamente centrifugado a 10.000 × g por 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o material foi deixado para secar à temperatura ambiente sobre papel filtro por aproximadamente 30 minutos. Por fim, o RNA foi ressuspendido em 30 µL de água tratada com DEPC.

A quantificação e a avaliação da pureza do RNA foram realizadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop™ One C. Amostras que apresentaram razão de absorbância A260/A280 superior a 1,8 foram consideradas de boa qualidade e adequadas para as análises subsequentes.

Para a síntese de cDNA e análise dos transcritos, aproximadamente 1 µg de RNA total foi submetido previamente a tratamento com DNase I para remoção de possíveis contaminantes de DNA genômico. Para isso, as amostras foram incubadas com 1 µL de DNase I (1 U/µL) e 1 µL de tampão DNase I a 37 °C por 15 minutos. A inativação da enzima foi realizada pela adição de 1 µL de EDTA 50 mM, seguida de incubação a 75 °C por 10 minutos.

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), conforme as recomendações do fabricante. Para cada amostra, foram preparadas duas reações: uma contendo a enzima transcriptase reversa (controle positivo) e outra sem a enzima (controle negativo), com o objetivo de

verificar a eficiência da transcrição reversa e descartar amplificação decorrente de DNA genômico residual.

Após a síntese de cDNA, foi realizada uma reação de PCR para confirmar a conversão do RNA em cDNA, utilizando o gene housekeeping β-actina (186 pb) como controle endógeno. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e corados com nitrato de prata a 0,2%.

Com a confirmação da eficiência da transcrição reversa, as amostras foram submetidas à PCR para detecção dos transcritos V0 e V89 (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo 0,4 µM de cada primer (sense e antisense), 3% de DMSO, 5 µL de LongAmp™ 2× Master Mix (Uniscience), 2 µL de cDNA diluído 1:5 e água ultrapura para completar o volume final. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 65 °C por 30 segundos, com extensão final a 65 °C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e corados com nitrato de prata a 0,2%, permitindo a visualização e confirmação dos fragmentos esperados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento e caracterização da cultura primária de células epiteliais da glândula mamária bovinas (bMECs)

Inicialmente, realizou-se o isolamento celular a partir de fragmentos de tecido da glândula mamária bovina obtidos do úbere de vacas da raça Gir, provenientes de um abatedouro localizado no município de Campos dos Goytacazes, RJ (Figura 16-A). Após o processamento mecânico e a digestão enzimática com colagenase e hialuronidase, os explantes foram distribuídos em placas de cultivo, onde permaneceram aderidos ao substrato, possibilitando o desprendimento gradual das células a partir do tecido (Figura 16-B). Após aproximadamente sete dias de cultivo, observou-se o estabelecimento de uma cultura celular heterogênea na região adjacente aos explantes, caracterizada pela presença concomitante de fibroblastos, com morfologia alongada e elevada capacidade de adesão (Figura 16-C), e de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs), com morfologia típica epitelial e crescimento organizado (Figura 16-D). Esse padrão é característico de culturas primárias derivadas de tecido mamário e evidencia a necessidade de estratégias subsequentes para o enriquecimento da população epitelial

antes da etapa de transfecção.

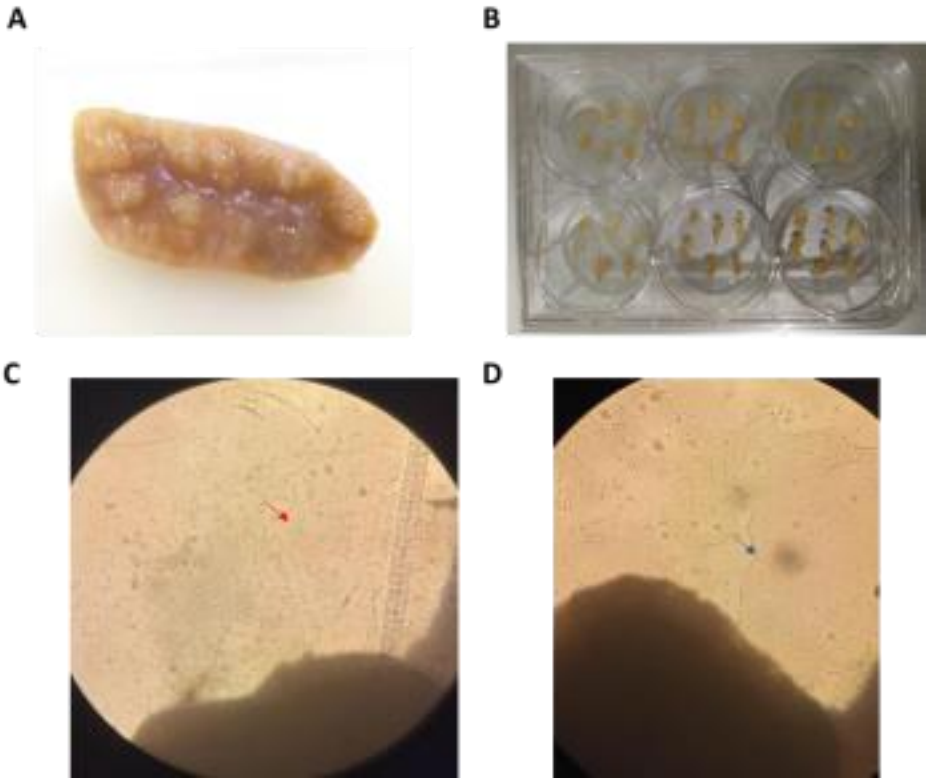


Figura 16. Estabelecimento do cultivo primário de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs). (A) Fragmento de tecido do úbere coletado de vacas provenientes de abatedouro localizado no município de Campos dos Goytacazes, RJ. (B) Explantes aderidos ao fundo de placa de cultivo de seis poços após digestão enzimática com colagenase e hialuronidase. (C) Presença predominante de fibroblastos aderidos, destacados pela seta vermelha, após sete dias de cultivo sem matriz extracelular, nas proximidades do explante (região sombreada). (D) Células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) aderidas, indicadas pela seta azul, após sete dias de cultivo sem matriz extracelular, próximas ao explante (região sombreada).

Após o isolamento celular a partir de fragmentos de tecido mamário bovino, as bMECs foram cultivadas em condições comparativas, na presença e na ausência de matriz extracelular Geltrex™, com o objetivo de avaliar o impacto do microambiente extracelular sobre a adesão, organização e diferenciação celular. Em ambas as condições, observou-se o estabelecimento inicial do cultivo primário, com crescimento celular visível ao redor dos explantes após poucos dias. Entretanto, ao longo do período de cultivo, diferenças no comportamento celular tornaram-se progressivamente mais evidentes, sugerindo que componentes de matriz extracelular podem influenciar a organização estrutural e a manutenção do fenótipo epitelial, conforme descrito por Monzani et al. (2016).

Nas culturas estabelecidas na presença de matriz extracelular, as células apresentaram adesão mais rápida ao substrato, organização espacial homogênea e

morfologia epitelial típica, caracterizada por células poligonais organizadas em monocamada contínua. Conforme ilustrado na Figura 17, após 12 horas de cultivo (Figura 17-A), observou-se predominantemente a adesão de fibroblastos ao substrato, com células migrando a partir do explante (seta vermelha), comportamento esperado nas fases iniciais do cultivo primário. Já após 24 horas (Figura 17-B), tornou-se evidente a adesão progressiva das bMECs ao redor do explante, indicando o início do estabelecimento da população epitelial favorecido pela interação célula–matriz.

Após o isolamento das bMECs e a realização da primeira passagem, as culturas apresentaram rápida expansão celular, atingindo aproximadamente 80% de confluência em três dias (Figura 17-C). Com cinco dias de cultivo, as células alcançaram 100% de confluência (Figura 17-D), exibindo morfologia uniforme e alto grau de diferenciação, com padrão epitelial bem definido, que destacam a importância da matriz extracelular na manutenção da identidade fenotípica de células epiteliais mamárias *in vitro*.

No sexto dia de cultivo, correspondente ao momento da segunda passagem para recipientes de maior área (garrafas ou múltiplas placas de seis poços), observou-se uma cultura homogênea e estável (Figura 17-E), com presença de corpúsculos citoplasmáticos, indicativos de elevado grau de diferenciação celular e intensa atividade metabólica. Esses achados reforçam que a matriz extracelular não apenas acelera a adesão e a proliferação das bMECs, mas também promove contato intercelular eficiente, ativação de vias de sinalização dependentes da matriz extracelular (ECM) e preservação do fenótipo epitelial ao longo do cultivo.

Em conjunto, os resultados demonstram que o uso de Geltrex™ é um fator determinante para o estabelecimento rápido e robusto de culturas de bMECs altamente diferenciadas, condição essencial para sua aplicação como modelo *in vitro* funcional e como biorreatores celulares para a produção de proteínas recombinantes.

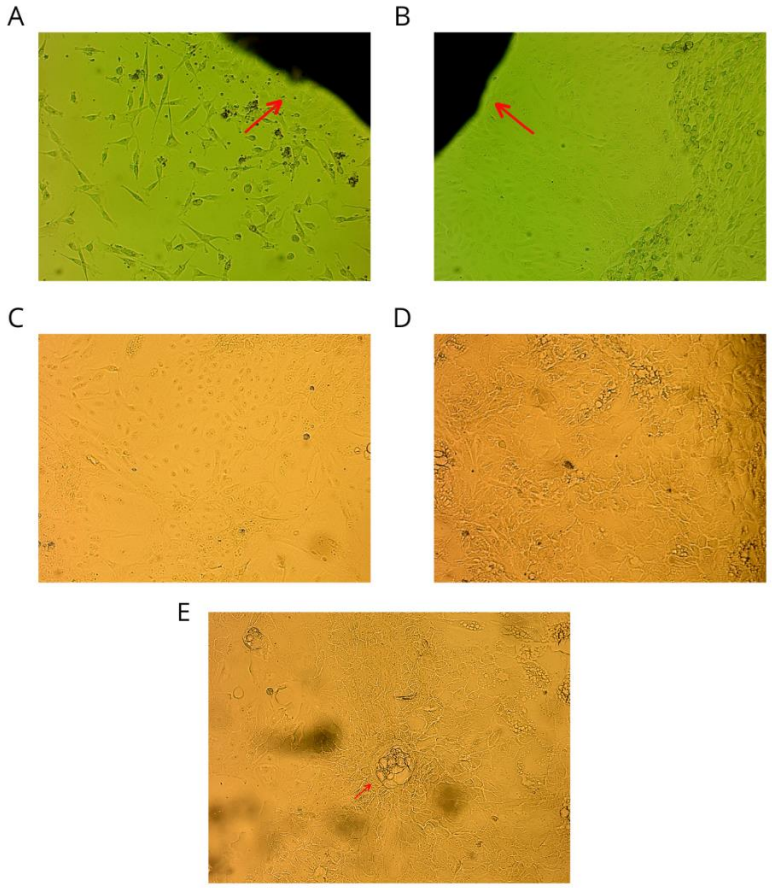


Figura 17: Estabelecimento e diferenciação de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) em cultura na presença de matriz extracelular. (A) Cultivo primário após 12 horas, evidenciando a adesão inicial de fibroblastos ao substrato e a migração celular a partir do explante (seta vermelha). (B) Cultivo após 24 horas, com bMECs aderidas ao redor do explante, indicando o início do estabelecimento da população epitelial. (C) Três dias após o isolamento das bMECs (primeira passagem), com aproximadamente 80% de confluência e organização celular homogênea. (D) Cinco dias de cultivo, com 100% de confluência, apresentando morfologia epitelial típica, com células poligonais organizadas em monocamada contínua, conforme descrito por Monzani et al. (E) Seis dias de cultivo, no momento da segunda passagem para recipientes de maior área, evidenciando uma cultura pura e homogênea, com presença de corpúsculos citoplasmáticos, indicativos de elevado grau de diferenciação celular.

Em comparação às culturas estabelecidas na presença de matriz extracelular, o cultivo de bMECs sem suporte matricial apresentou desempenho significativamente inferior. Conforme observado na Figura 18, após 24 horas (Figura 18-A) a adesão celular foi mínima, com praticamente todas as células permanecendo em suspensão. Após 48 horas (Figura 18-B), embora seja possível observar discreto aumento no número de células aderidas, a maioria encontrava-se não aderida ao substrato, indicando um lento processo inicial de estabelecimento ao substrato.

Essa baixa adesão refletiu-se diretamente na organização celular ao longo do cultivo, resultando em maior heterogeneidade morfológica e predominância progressiva de fibroblastos. As bMECs demonstraram dificuldade em formar uma monocamada epitelial contínua, sugerindo prejuízo na manutenção do fenótipo diferenciado na ausência de interações célula–matriz. Consequentemente, o tempo para atingir altos níveis de

confluência (>80%) foi prolongado, frequentemente demandando semanas para a obtenção de um cultivo homogêneo.

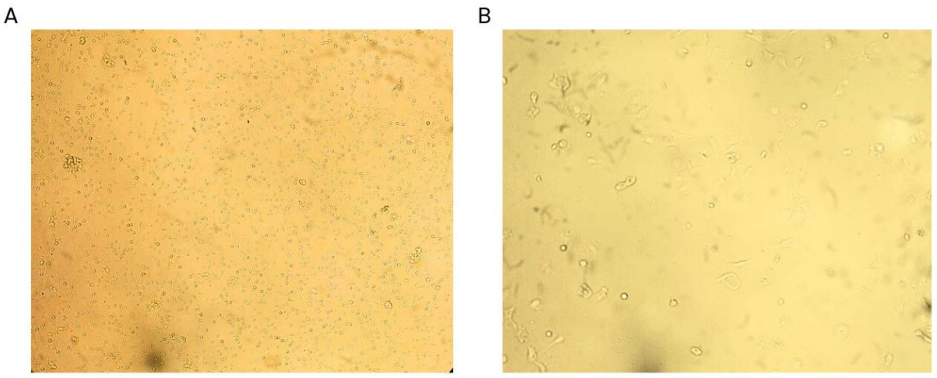


Figura 18: Cultivo de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) na ausência de matriz extracelular. (A) Cultivo após 24 horas, evidenciando baixa adesão celular, com praticamente todas as celulas em suspensão. (B) Cultivo após 48 horas, mantendo-se a escassez de células aderidas, sem organização epitelial típica.

Adicionalmente, o maior tempo necessário para o estabelecimento do cultivo na ausência de matriz extracelular representa uma limitação prática importante. Cultivos prolongados mantêm as bMECs por períodos extensos em manipulação contínua, aumentando a exposição a possíveis contaminantes ambientais e, consequentemente, o risco de contaminação microbiológica. Eventuais perdas do cultivo nessas condições resultam no descarte das células e na perda de semanas de trabalho experimental, uma vez que o restabelecimento do cultivo exige o reinício das etapas iniciais até que se atinja novamente o estágio anterior. Dessa forma, a lentidão no desenvolvimento celular compromete a eficiência e a robustez do modelo *in vitro*.

Nesse contexto, após o estabelecimento de culturas purificadas de bMECs, foi realizada a criopreservação das células com o objetivo de constituir um banco celular. Essa estratégia visa evitar a necessidade de reiniciar o cultivo a partir da coleta de tecido mamário e digestão enzimática, etapas que demandam tempo, elevada manipulação e apresentam variabilidade significativa quanto à qualidade do material biológico obtido. Ressalta-se que amostras de tecido de baixa qualidade também comprometem o rendimento celular e atrasam substancialmente o andamento dos experimentos. Assim, a criação de um banco de bMECs purificadas contribui para a padronização experimental, maior reprodutibilidade dos resultados e otimização do tempo de execução do estudo.

Esses achados estão em concordância com estudos prévios, como os de Monzani et al., 2016, que demonstram que o uso de matrizes extracelulares ricas em componentes

da lâmina basal, como laminina e colágeno IV, promove maior adesão, diferenciação e organização estrutural de células epiteliais mamárias, além de favorecer a comunicação célula–célula e a preservação do fenótipo epitelial. Assim, os resultados obtidos reforçam a importância do uso de matriz extracelular no cultivo primário de bMECs, especialmente quando o objetivo é estabelecer um modelo celular funcionalmente competente para aplicações biotecnológicas, como a produção de proteínas recombinantes.

4.2 Avaliação da incorporação genômica dos plasmídeos pFN1-V0/V89 por genotipagem molecular

A incorporação do transgene pFN1-V0/V89 nas células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) foi avaliada de forma integrada nos níveis transcricional e genômico, permitindo a confirmação tanto da expressão funcional quanto da inserção do constructo no genoma bovino (Figura 19). A análise dos transcritos correspondentes às isoformas V0 e V89 da fibronectina humana foi realizada a partir de cDNA por meio da técnica de *single-tube nested PCR* (ST-nPCR), uma abordagem de alta sensibilidade particularmente indicada para a detecção de transgenes de baixa abundância inicial e derivados de construções plasmidiais extensas. Essa técnica consiste na amplificação sequencial, em um único tubo, utilizando pares de *primers* externos e internos, o que aumenta significativamente a especificidade e reduz o risco de amplificações inespecíficas ou contaminações cruzadas, sendo amplamente empregada em análises de integração gênica e expressão inicial pós-edição.

Por meio da ST-nPCR, foi possível detectar a presença dos transcritos V0 (164 pb) e V89 (135 pb) exclusivamente nas amostras lipofectadas (Figura 19-A). Como controles positivos, os plasmídeos pFN1-V0 e pFN1-V89 foram amplificados com sucesso, bem como a região “full”, que abrange ambas as isoformas, confirmando a integridade da construção plasmidial e a especificidade da amplificação. Não foi observada amplificação nas amostras controle não lipofectadas nem em amostras de DNA genômico bovino, evidenciando que os sinais detectados derivam exclusivamente da transcrição do cassette pFN1-V0/V89, e não de amplificação residual de DNA plasmidial ou genômico.

A confirmação da inserção genômica foi obtida por genotipagem molecular utilizando PCR convencional, direcionada à amplificação da região BLG–ROSA26 (1015 pb), a qual foi detectada apenas nas amostras lipofectadas (Figura 19-B). A ausência desse fragmento nas células controle e em DNA genômico bovino reforça que a integração ocorreu de forma direcionada, validando a estratégia de edição gênica mediada pelo

sistema CRISPR-Cas9 empregada neste estudo.

Do ponto de vista técnico, a inserção de fragmentos longos de DNA permanece um dos maiores desafios da engenharia genômica em células de mamíferos. Estratégias baseadas em recombinação homóloga (HDR) apresentam limitações significativas, especialmente devido à dependência das fases S e G2 do ciclo celular e à baixa eficiência em eventos de *knock-in* envolvendo construções extensas. Nesse contexto, o uso da via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) emerge como uma alternativa robusta para inserções direcionadas em loci genômicos seguros, como o ROSA26 bovino, conforme demonstrado por Yuan et al. (2021).

A escolha do locus ROSA26 para a inserção do pFN1-V0/V89 fundamenta-se em seu amplo reconhecimento como região permissiva para expressão estável e segura de transgenes em diferentes espécies, incluindo camundongos, coelhos e suínos (Zambrowicz et al., 1997; Yang et al., 2016; Li et al., 2014). Adicionalmente, a construção plasmidial incorporou o promotor da beta-lactoglobulina (BLG), amplamente utilizado para direcionar a expressão gênica à glândula mamária e já validado em modelos ovinos, caprinos e bovinos (McCreath et al., 2000; Koloskova et al., 2020).

Um dos aspectos mais inovadores deste trabalho reside na inserção bem-sucedida de um plasmídeo de aproximadamente 12 kb em células bovinas, um feito ainda pouco descrito na literatura. A estratégia combinando Cas9 nickase, sgRNAs pareados e ssODNs mostrou-se promissora para contornar limitações associadas a quebras de dupla fita, reduzindo efeitos off-target e aumentando a precisão da edição genômica (Fujii et al., 2014; Fu et al., 2019).

No contexto funcional, a incorporação das construções pFN1-V0 e pFN1-V89 resulta na geração de uma população celular geneticamente modificada composta por células que expressam, de forma independente, cada uma das isoformas da fibronectina humana. Embora cada célula expresse apenas uma isoforma específica, a secreção dessas variantes para o meio extracelular permite sua coexistência e interação funcional, reproduzindo de forma mais fiel a complexidade fisiológica da matriz extracelular. Assim, a obtenção de uma população mista não representa uma limitação experimental, mas sim uma estratégia eficiente para a produção de uma fibronectina recombinante estruturalmente e funcionalmente mais próxima da proteína nativa.

Além disso, essa plataforma abre perspectivas para etapas futuras, como o isolamento clonal de células produtoras de cada isoforma ou a modulação controlada da proporção entre variantes, ampliando o potencial de aplicação do sistema em biotecnologia, engenharia tecidual e produção de biofármacos. Dessa forma, os resultados

obtidos consolidam as bMECs como uma plataforma promissora para a produção de proteínas recombinantes complexas e posicionam este estudo como um avanço conceitual e técnico na engenharia genética bovina.

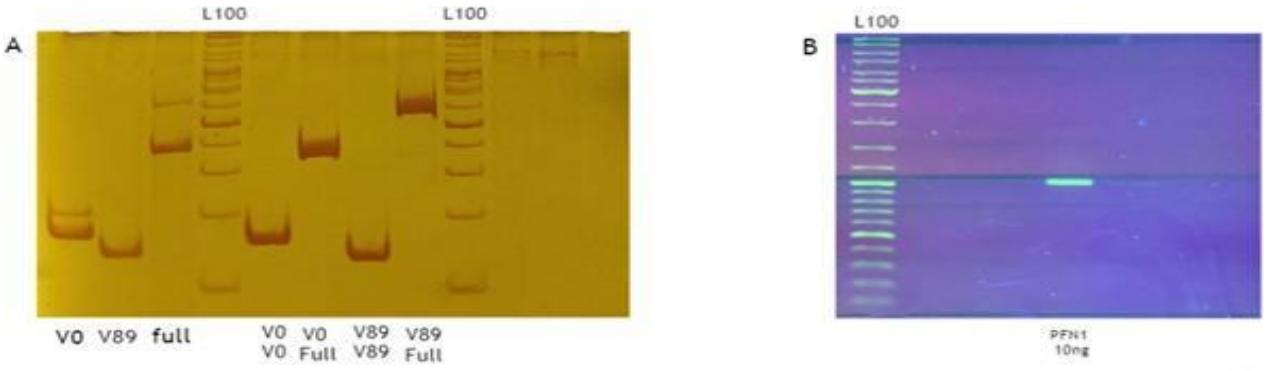


Figura 19: Análise da incorporação do transgene pFN1-V0/V89 em células bovinas. (A) Gel de poliacrilamida confirmando a transcrição das regiões V0 (164 pb) e V89 (135 pb) nas células lipofectadas, sem amplificação nos controles. (B) Gel de agarose evidenciando a incorporação do plasmídeo no genoma bovino (BLG-ROSA26 – 1015 pb), ausente nos controles não lipofectados e no DNA genômico bovino.

4.3 Isolamento e expansão de colônias monoclonais transgênicas

Para o estabelecimento do protocolo de isolamento de colônias celulares, foi realizado inicialmente um experimento piloto utilizando células de fibroblastos, com o objetivo de padronizar as condições de semeadura, aderência e expansão clonal em placas de 96 poços. A estratégia teve como finalidade a futura obtenção de colônias monoclonais transgênicas puras, fundamentais para garantir homogeneidade genética e estabilidade da edição gênica nas análises subsequentes.

Conforme apresentado na Figura 20-A, o experimento foi conduzido em uma placa de 96 poços, na qual o poço A1 continha inicialmente uma suspensão celular na concentração de 2×10^4 células/mL, seguida de diluição seriada. Do total de 96 poços, aproximadamente 14 apresentaram células aderidas, predominantemente nos poços adjacentes ao A1, indicando uma distribuição compatível com a obtenção de colônias derivadas de uma única célula. Após um período de aproximadamente 15 dias de cultivo, as colônias formadas foram submetidas à tripsinização e realocadas para placas de 24 poços (Figura 20-B), visando à expansão celular.

As células permaneceram em cultivo por cerca de 5 dias adicionais, período no qual foi possível observar aderência eficiente e confluência de até 70% nos poços expandidos. A partir desse ensaio piloto, constatou-se que o uso da matriz extracelular Geltrex™ foi imprescindível para promover a adesão celular, a sobrevivência pós-isolamento e a expansão das colônias, corroborando observações prévias de que o suporte

matricial é determinante para a manutenção da viabilidade celular em condições de baixa densidade.

O mesmo protocolo foi aplicado no ensaio de lipofecção com os plasmídeos pFN1-V0/V89, visando ao isolamento de colônias bMEC-pFN1-V0/V89^{+}. No entanto, esse experimento específico foi interrompido em decorrência de uma queda de energia no laboratório, resultando na perda das culturas. Ainda assim, durante o período inicial pós-lipofecção, foi possível observar uma redução significativa na densidade celular, sugerindo perda celular associada ao procedimento de transfecção como descreveu Lv et al., 2006. Esse efeito pode estar relacionado, ao menos em parte, à citotoxicidade da Lipofectamina™ CRISPRMAX™**,** especialmente em condições de edição gênica envolvendo múltiplos componentes, como RNPs, ssODNs e plasmídeos de grande tamanho (Kim et al., 2014). A literatura indica que vetores de lipídios catiônicos e polímeros usados em transfecção não viral podem induzir respostas celulares adversas, incluindo redução da viabilidade celular e alterações morfológicas, dependendo da composição e da dose dos reagentes lipofeccionantes (Yu et al., 2016).

Esse achado reforça a importância da etapa de padronização prévia do isolamento clonal e destaca a necessidade de otimização das condições de transfecção, de modo a equilibrar eficiência de edição gênica e viabilidade celular. O experimento será repetido, com ajustes nas condições de cultivo e recuperação celular pós-lipofecção, visando ao isolamento eficiente de colônias monoclonais transgênicas puras de bMECs pFN1-V0/V89^{+} para validações genotípicas e funcionais subsequentes.

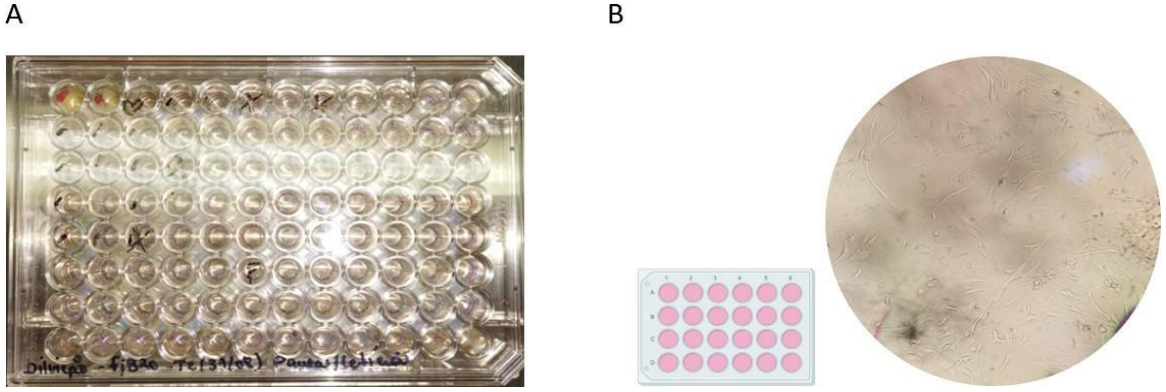


Figura 20: Isolamento de colônia celular transgênica. (A) Placa de 96 poços com fibroblastos em diluição celular após 15 dias de cultivo. (B) Placa de 24 poços com 14 poços contendo células aderidas, apresentando cerca de 70% de confluência após 5 dias da primeira tripsinização.

5. CONCLUSÃO

- O uso de matriz extracelular (Geltrex) mostrou-se superior ao cultivo sem matriz**,** sendo útil na otimização do tempo de estabelecimento do cultivo**,** além de auxiliar na

manutenção do fenótipo epitelial e na diferenciação inicial das células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) durante as fases iniciais de cultivo.

- Foi estabelecida uma estratégia para edição gênica mediada por CRISPR-Cas9, tendo como alvo o *locus* ROSA26 do genoma bovino, reconhecido como um sítio permissivo para inserção gênica estável.
- O desenho de pares de sgRNAs, aliado ao uso da Cas9D10A (nickase) e ssODNs, contribuiu para a especificidade da edição gênica, minimizando a ocorrência de quebras de dupla fita não desejadas e potenciais efeitos *off-target*.
- A Single-Tube Nested PCR (STn-PCR) demonstrou ser uma ferramenta sensível e eficiente para a genotipagem, permitindo a detecção de eventos de edição gênica mesmo em amostras contendo baixa proporção de alelos modificados.
- A utilização de ssODNs como moldes de reparo homólogo mostrou-se uma abordagem viável para estratégias de *knock-in* preciso, reforçando seu potencial em aplicações de engenharia genômica em células bovinas.
- O protocolo de isolamento de colônias celulares foi padronizado em um experimento piloto com fibroblastos, possibilitando a avaliação de parâmetros críticos como densidade celular, tempo de cultivo e suporte por matriz extracelular; entretanto, sua aplicação em bMECs geneticamente editadas ainda necessita de validação experimental**.**
- Este trabalho estabelece bases metodológicas para o desenvolvimento e aprimoramento de estratégias de engenharia genética da glândula mamária bovina, contribuindo para futuras aplicações em biomedicina, biotecnologia e sistemas celulares biorreatores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Genetically modified foods: questions and answers*. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/food-genetically-modified. Acesso em: 5 mar. 2026.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Glossary of biotechnology for food and agriculture*. Rome: FAO, 2001. Disponível em: https://www.fao.org/3/y2775e/y2775e00.htm. Acesso em: 5 mar. 2026.

MURRAY, James D.; MOHAMAD-FAUZI, Nuradilla; COOPER, Caitlin A.; MAGA, Elizabeth A. Current status of research on transgenic animals for applications in human health. Acta Scientiae Veterinariae, v. 38, suppl. 2, p. S627–S632, 2010.

SHAKWEER, W. M. E.; KRIVORUCHKO, A. Y.; DESSOUKI, Sh. M.; KHATTAB, A. A. A review of transgenic animal techniques and their applications. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 21, n. 1, p. 1–19, 2023. DOI: 10.1186/s43141-023-00502-z.

LIU, Y.; BAI, X.; FENG, X.; LIU, S.; HU, Y.; CHU, H.; ZHANG, L.; CAI, B.; MA, Y. Revolutionizing animal husbandry: breakthroughs in gene editing delivery systems. Gene, v. 935, p. 149044, 2025. DOI: 10.1016/j.gene.2024.149044.

PESQUERO, João B. et al. Applications of transgenic animals. Scientific American Brasil Online. Available at: http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/aplicacees_dos_animais_transgenicos.html. Accessed on: Nov. 8, 2013.

ABATE, Tadesse. Transgenic animal production and applications. Advances in Life Science and Technology, v. 61, 2017.

SHAKWEER, W. M. E. et al. Cloning and characterisation of orthologous genes encoding growth hormone in Egyptian Holstein crossbred and Ossimi sheep. International Journal of Research Studies in Biosciences, v. 3, n. 3, p. 57–72, 2015.

TAN, Minjie et al. Microinjection induces changes in the transcriptome of bovine oocytes. Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 11211, 2020.

MENG, F. et al. Optimized production of transgenic buffalo embryos and offspring by cytoplasmic zygote injection. Journal of Animal Science and Biotechnology, v. 6, p. 44, 2015. DOI: 10.1186/s40104-015-0044-x.

KRIMPENFORT, P. et al. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. Nature Biotechnology, v. 9, p. 844–847, 1991. DOI: 10.1038/nbt0991-844.

KARATZAS, C. N. Designer milk from transgenic clones. Nature Biotechnology, v. 21, p. 183, 2003.

HODGES, C. A.; STICE, S. L. Generation of transgenic cattle using somatic cell nuclear transfer. Reproductive Biology and Endocrinology, v. 1, p. 81, 2003. DOI: 10.1186/1477-7827-1-81.

WILMUT, I.; BAI, Y.; TAYLOR, J. Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 370, n. 1680, p. 20140366, 2015.

MONZANI, Paulo S. et al. Human proinsulin production in the milk of transgenic cattle. Biotechnology Journal, v. 19, n. 3, p. 2300307, 2024.

MALIN, Katarzyna; WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ, Olga; PAPIS, Krzysztof. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. Theriogenology, v. 189, p. 246–254, 2022.

AKAGI, S.; MATSUKAWA, K.; TAKAHASHI, S. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. Journal of Reproduction and Development, v. 60, n. 5, p. 329–335, 2014.

EMBRAPA. Embrapa research will benefit hemophiliacs. Available at: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17978261/pesquisa-da-embrapa-vai-beneficiar-hemofilicos. Accessed on: Sept. 12, 2025.

COLLARES, Tiago et al. Transgenic animals as bioreactors. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 4, p. 462–478, 2007.

NOSEDA, Diego G. et al. Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a high-level expression transformant clone of Pichia pastoris. Protein Expression and Purification, v. 123, p. 112–121, 2016.

ASFAW, Amare Bihon; ASSEFA, Ayalew. Animal transgenesis technology: A review. *Cogent Food & Agriculture*, v. 5, n. 1, p. 1686802, 2019.

BACH, Karsten et al. Differentiation dynamics of mammary epithelial cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

BERTOLINI, Leonardo R. et al. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, v. 25, n. 3, p. 329–343, 2016.

DEYKIN, Alexander V. et al. Genetically modified animals for biopharmacology use: From research to production. *Research Results in Pharmacology*, v. 7, n. 4, p. 11–27, 2021.

FU, Min et al. Establishment of mammary gland model in vitro: Culture and evaluation of a yak mammary epithelial cell line. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. e116996, 2014.

GIASSETTI, Mariana Ianello et al. In vitro culture of ovine mammary gland cells expressing beta-lactoglobulin and beta-casein. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 54, n. 2, p. 188–196, 2017.

HAMZAOUI, Samir et al. Method for isolation of bovine sweat gland and conditions for in vitro culture. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 5, p. 4638–4642, 2018.

JÄNNE, Juhani et al. Transgenic bioreactors. *International Journal of Biochemistry*, v. 26, n. 7, p. 859–870, 1994.

KAAVYA, R. et al. Isolation of spermatogonial stem cells and their viability in mice by different enzymatic digestion methods. *International Journal of Livestock Research*, v. 6, n. 11, p. 54–60, 2016.

KAISER, Gisela G. et al. Detection of recombinant human lactoferrin and lysozyme produced in a bitransgenic cow. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 3, p. 1605–1617, 2017.

KIBBEY, Mary C. Maintenance of EHS sarcoma and preparation of Matrigel. *Journal of Tissue Culture Methods*, v. 16, p. 227–230, 1994.

KOBAYASHI, Ken. Culture models to investigate mechanisms of milk production and blood–milk barrier in mammary epithelial cells: A review and a protocol. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2023.

LEE, Brian et al. Cell culture process scale-up challenges for commercial-scale manufacturing of allogeneic pluripotent stem cell products. *Bioengineering*, v. 9, n. 3, p. 92, 2022.

MONZANI, Priscila S. et al. Transgenic bovines as bioreactors: Challenges and perspectives. *Bioengineered*, v. 7, n. 3, p. 123–131, 2016.

MOODY, Janelle et al. Successful editing and maintenance of lactogenic gene expression in primary bovine mammary epithelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, v. 59, n. 5, p. 316–330, 2023.

MROUE, Rana; BISSELL, Mina J. Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells. *Methods in Molecular Biology*, v. 945, p. 221–250, 2013.

MUROYA, Susumu et al. Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in cultured bovine mammary epithelial cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 8, 2016.

QIAN, Lin et al. Isolation and culture of primary human mammary epithelial cells. *Journal of Visualized Experiments*, n. 207, 2024. DOI: 10.3791/66638.

SKOG, Martin et al. The effect of enzymatic digestion on epithelial autografts cultured in vitro. *Cell Transplantation*, v. 28, n. 5, p. 638–644, 2019.

WALSH, Gary. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 2018.

XU, Peng et al. In vitro culture and evaluation of bovine mammary epithelial cells from Ukrainian dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 22, n. 1, p. 65–71, 2021.

YIN, Z. et al. Position effect variegation and epigenetic modification of a transgene in a pig model. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 1, p. 355–369, 2012.

ZHAN, Kang et al. Three-dimensional culture system can induce expression of casein in immortalized bovine mammary epithelial cells. *Animal Science Journal*, v. 88, n. 5, p. 817–825, 2017.

ZHOU, Wei et al. Generation of beta-lactoglobulin knockout goats using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE*, v. 12, n. 10, p. e0186056, 2017.

ZOLLINGER, A. J.; SMITH, M. L. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biology*, v. 60, p. 27–37, 2017.

JARA, C. P. et al. A novel fibrin–fibronectin matrix accelerates wound healing in mouse skin. *Bioactive Materials*, v. 5, n. 4, p. 949–962, 2020.

POTTS, J. R.; CAMPBELL, I. D. Fibronectin structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 6, n. 5, p. 648–655, 1994.

PATTEN, J.; WANG, K. Fibronectin in development and wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 170, p. 353–368, 2021.

EBBINGHAUS, C. et al. Diagnostic and therapeutic applications of recombinant antibodies: targeting the extra-domain B of fibronectin, a marker of tumor angiogenesis. *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, n. 13, p. 1537–1549, 2004. DOI: 10.2174/1381612043384808.

HERRANZ-DIEZ, C. et al. Tuning mesenchymal stem cell response onto titanium–niobium–hafnium alloy by recombinant fibronectin fragments. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 8, n. 4, p. 2517–2525, 2016. DOI: 10.1021/acsami.5b10587.

LLOPIS-HERNANDEZ, V. et al. Material-based strategies to engineer fibronectin matrices for regenerative medicine. *International Materials Reviews*, v. 60, n. 5, p. 245–264, 2015.

GECCHELE, E. et al. A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems. *Journal of Visualized Experiments*, n. 97, p. 52459, 2015.

GAGOSKI, D. et al. Performance benchmarking of four cell-free protein expression systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 113, n. 2, p. 292–300, 2016.

YIN, J. et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 335–347, 2007. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012.

HUNTER, M.; YUAN, P.; VAVILALA, D.; FOX, M. Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current Protocols in Protein Science*, v. 95, n. 1, e77, 2019. DOI: 10.1002/cpps.77.

HONG, M. et al. Genetic engineering of the baculovirus–insect cell system to improve protein production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 994743, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.994743.

DU, M. et al. Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technologies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 1028691, 2022.

DALTON, C. J.; LEMMON, C. A. Fibronectin: molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. *Cells*, v. 10, n. 9, p. 2443, 2021.

ZHU, J.; CLARK, R. A. F. Fibronectin at select sites binds multiple growth factors and enhances their activity: expansion of the collaborative ECM–GF paradigm. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 134, n. 4, p. 895–901, 2014. DOI: 10.1038/jid.2013.484.

DONG, Y. et al. Treatment of acute wounds with recombinant human-like collagen and recombinant human-like fibronectin in C57BL/6 mice individually or in combination. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 908585, 2022.

GIMENO-LLUCH, I. et al. The role of the fibronectin synergy site in cutaneous wound healing. *Cells*, v. 11, n. 13, p. 2100, 2022.

LEMMON, C. A.; WEINBERG, S. H. Multiple cryptic binding sites are required for robust fibronectin assembly: an in silico study. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 18061, 2017.

GARRISON, C. M.; SCHWARZBAUER, J. E. Fibronectin fibril alignment is established after initiation of extracellular matrix assembly. *Molecular Biology of the Cell*, v. 32, n. 8, p. 739–752, 2021.

HIELSCHER, A. et al. Fibronectin deposition participates in extracellular matrix assembly and vascular morphogenesis. *PLoS ONE*, v. 11, n. 1, p. e0147600, 2016.

MILLER, R. et al. Systematic review of fibrin glue in burn wound reconstruction. *British Journal of Surgery*, v. 106, n. 3, p. 165–173, 2019.

MAS-MORUNO, C. et al. αvβ3- or α5β1-integrin-selective peptidomimetics for surface coating. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 25, p. 7048–7067, 2016.

PARISI, L. et al. An overview of the role of fibronectin in controlling cellular responses at the biomaterial interface. *Japanese Dental Science Review*, v. 56, n. 1, p. 50–55, 2020.

ABUDAYYEH, Omar O. *et al.* RNA targeting with CRISPR–Cas13. Nature, v. 550, n. 7675, p. 280–284, 2017.

ANZALONE, Andrew V. *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature, v. 576, n. 7785, p. 149–157, 2019.

BABU, Kesavan *et al.* Coordinated actions of the Cas9 HNH and RuvC nuclease domains are regulated by the bridge helix and target DNA sequence. Biochemistry, v. 60, n. 49, p. 3783–3800, 2021.

BOLONIN, A. *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.

BOTI, Michaela A. *et al.* Recent advances in genome engineering strategies. Genes, v. 14, n. 1, p. 129, 2023.

BROWNING, J. *et al.* Highly efficient CRISPR-targeting of the murine Hipp11 intergenic region supports inducible human transgene expression. Molecular Biology Reports, v. 47, n. 2, p. 1491–1498, 2020.

CABRERA, Alan *et al.* The sound of silence: transgene silencing in mammalian cell engineering. Cell Systems, v. 13, n. 12, p. 950–973, 2022.

CHANG, Angela Y. Genome engineering with CRISPR/Cas9, ZFNs, and TALENs. In: CRISPR Genome Surgery in Stem Cells and Disease Tissues. London: Academic Press, 2022. p. 39–45.

CHEN, C. M. *et al.* A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using ΦiC31 integrase-mediated cassette exchange. PLoS ONE, v. 6, n. 8, e23376, 2011.

CHU, Van Trung *et al.* Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9. BMC Biotechnology, v. 16, n. 1, p. 4, 2016.

DANG, L. *et al.* Correction of the pathogenic mutation in TGM1 by adenine base editing in embryos. Molecular Therapy, v. 30, n. 1, p. 175–183, 2022.

DOMINGUEZ, A. A. *et al.* CRISPR-mediated synergistic epigenetic and transcriptional control. The CRISPR Journal, v. 5, n. 2, p. 264–275, 2022.

GUO, Tao *et al.* Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion. Genome Biology, v. 19, n. 1, p. 170, 2018.

HARRINGTON, Lucas B. *et al.* A thermostable Cas9 with increased lifetime in human plasma. Nature Communications, v. 8, n. 1, p. 1424, 2017.

HOU, Senqin; YANG, Shibin; BAI, Wenqin. Multigene precision editing using CRISPR-Cas12a/Cpf1 in *Ogataea polymorpha*. Microbial Cell Factories, v. 24, n. 1, p. 28, 2025.

JINEK, Martin *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease. Science, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.

JEONG, Y. H. *et al.* Knock-in fibroblasts and transgenic blastocysts expressing human FGF2 in cattle. Zygote, v. 24, n. 3, p. 442–456, 2016.

LI, Dan-Yuan; LI, Long-Qi; LIU, Jun-Jie Gogo. Nucleases in gene-editing technologies. National Science Open, v. 2, n. 5, p. 20220067, 2023.

LI, Dongxu *et al.* Genetically engineered goats as mammary gland bioreactors using CRISPR/Cas9. Biology, v. 13, n. 6, p. 367, 2024.

LIU, Mingjie *et al.* Methodologies for improving HDR efficiency. Frontiers in Genetics, v. 9, p. 691, 2019.

MOJICA, F. J. M. *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats. Molecular Microbiology, v. 36, n. 1, p. 244–246, 2000.

MOJICA, F. J. M. *et al.* Intervening sequences derive from foreign genetic elements. Journal of Molecular Evolution, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.

MURAKAMI, Y. *et al.* Nickase-mediated efficient knock-in in *Oryzias latipes*. Development, Growth & Differentiation, v. 62, n. 9, p. 554–567, 2020.

NORRMAN, K. *et al.* Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. PLoS ONE, v. 5, n. 8, e12413, 2010.

PAQUET, Dominik *et al.* Efficient introduction of homozygous and heterozygous mutations. Nature, v. 533, n. 7601, p. 125–129, 2016.

QUADROS, Rolen M. *et al.* Easi-CRISPR: a robust method using long ssDNA donors. Genome Biology, v. 18, n. 1, p. 92, 2017.

RAN, F. Ann *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. Nature, v. 520, n. 7546, p. 186–191, 2015.

RICHARDSON, Christopher D. *et al.* Enhancing HDR using asymmetric donor DNA. Nature Biotechnology, v. 34, n. 3, p. 339–344, 2016.

SALSMAN, Jayme; DELLAIRE, Graham. Precision genome editing in the CRISPR era. Biochemistry and Cell Biology, v. 95, n. 2, p. 187–201, 2017.

SHIN, S. *et al.* Comprehensive analysis of genomic safe harbors in HEK293 cells. ACS Synthetic Biology, v. 9, n. 6, p. 1263–1273, 2020.

WU, Junhao *et al.* CRISPR/Cas-mediated genome editing in genetic hearing loss. Cell & Bioscience, v. 13, n. 1, p. 93, 2023.

XIE, Y. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knock-in at the bovine Rosa26 locus. PLoS ONE, v. 17, n. 11, e0276811, 2022.

XUE, C.; GREENE, E. C. DNA repair pathway choices in CRISPR editing. Trends in Genetics, v. 37, n. 7, p. 639–656, 2021.

YOSHIMI, Kazuto *et al.* ssODN-mediated knock-in for large genomic regions. Nature Communications, v. 7, n. 1, p. 10431, 2016.

ZHANG, Jian-Ping *et al.* Efficient precise knock-in with a double-cut HDR donor. Genome Biology, v. 18, n. 1, p. 35, 2017.

ZHOU, S. *et al.* Site-specific integration of antibody genes in CHO-K1 cells. Preparative Biochemistry & Biotechnology, v. 49, n. 4, p. 384–390, 2019.

CHONG, Zhi Xiong; YEAP, Swee Keong; HO, Wan Yong. Transfection types, methods and strategies: a technical review. PeerJ, v. 9, e11165, 2021.

ELSHEREEF, A. A. *et al.* High cell density transient transfection of CHO cells for TGF-β1 expression. Engineering in Life Sciences, v. 19, n. 11, p. 730–740, 2019.

FELGNER, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 84, n. 21, p. 7413–7417, 1987. DOI: 10.1073/pnas.84.21.7413.

FUS-KUJAWA, Agnieszka *et al.* An overview of methods and tools for transfection of eukaryotic cells *in vitro*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 9, p. 701031, 2021.

HOU, Xucheng *et al.* Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nature Reviews Materials, v. 6, n. 12, p. 1078–1094, 2021.

KAZEMIAN, P. *et al.* Lipid-nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 genome-editing components. Molecular Pharmaceutics, v. 19, n. 6, p. 1669–1686, 2022.

KONG, Weiwen *et al.* Role of size, surface charge, and PEGylated lipids of lipid nanoparticles on intramuscular delivery of mRNA. Journal of Nanobiotechnology, v. 22, n. 1, p. 553, 2024.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Lipofection. Cold Spring Harbor Protocols, v. 3, p. pdb.topo096248, 2019.

MA, B. *et al.* Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. Journal of Controlled Release, v. 123, n. 3, p. 184–194, 2007.

MEHTA, Meenu *et al.* Lipid-based nanoparticles for drug/gene delivery: production techniques and industrial challenges. ACS Materials Au, v. 3, n. 6, p. 600–619, 2023.

NAWAZ, M. *et al.* Lipid nanoparticles deliver therapeutic VEGFA mRNA *in vitro* and *in vivo*. Advanced Science, v. 10, n. 12, e2206187, 2023.

PAVLOV, R. V. *et al.* Boosting lipofection efficiency through enhanced membrane fusion mechanisms. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 24, p. 13540, 2024.

POTTER, Huntington; HELLER, Richard. Electroporation-mediated transfection. Current Protocols in Molecular Biology, v. 121, n. 1, p. 9.3.1–9.3.13, 2018.

RAMAMOORTH, Murali; NARVEKAR, Aparna. Non-viral vectors in gene therapy: an overview. Journal of Clinical and Diagnostic Research, v. 9, n. 1, p. GE01, 2015.

SOROUDI, S.; JAAFARI, M. R.; ARABI, L. Lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery in cardiovascular diseases. Journal of Controlled Release, v. 372, p. 113–140, 2024.

VLASOVA, K. Yu. *et al.* Synthesis of ionizable lipopolymers for pulmonary RNA delivery and gene editing. Nature Communications, v. 16, n. 1, p. 4021, 2025.

WARGA, E. *et al.* Transcriptomic analysis of the innate immune response to plasmid DNA transfection. Molecular Therapy – Nucleic Acids, v. 31, p. 43–56, 2022.

XU, Wenhao. Microinjection and micromanipulation: a historical perspective. In: Microinjection: Methods and Protocols. New York: Springer, 2018. p. 1–16.

ZHI, D. F. *et al.* Comparison of two kinds of cationic vector-mediated gene delivery. Yao Xue Xue Bao, v. 44, n. 5, p. 553–557, 2009.

CAMPBELL, K. H. S.; WILMUT, I. *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, v. 385, p. 810–813, 1997. DOI: 10.1038/385810a0.

LI, Tianxiang *et al.* CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 8, n. 1, p. 36, 2023.

PESQUISA FAPESP. Cabras, coelhas e vacas transgênicas produzem fármacos de uso humano. Revista Pesquisa FAPESP, ed. 328, out. 2023. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/cabras-coelhas-e-vacas-transgenicas-produzem-farmacos-de-uso-humano/. Acesso em: 11 out. 2025.

SHALABY, Karim; AOUIDA, Mustapha; EL-AGNAF, Omar. Tissue-specific delivery of CRISPR therapeutics. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 19, p. 7353, 2020.

SHAMSHIRGARAN, Yasaman *et al.* Tools for efficient genome editing: ZFN, TALEN, and CRISPR. In: Applications of Genome Modulation and Editing. 2022. p. 29–46.

JÄNNE, J. *et al.* Transgenic bioreactors. International Journal of Biochemistry, v. 26, n. 7, p. 859–870, 1994.

KOLOSKOVA, E. M.; EZERSKIY, V. A.; OSTRENKO, K. S. Modifications of the beta-lactoglobulin gene in bovine and goats for correction of milk composition using CRISPR/Cas9 technology. Journal of Livestock Science, n. 12, 2021.

LI, J.-X. *et al.* Development and validation of an immortalized bovine mammary epithelial cell line as an *in vitro* model to study mammary gland functions. Cytotechnology, v. 70, n. 1, p. 67–82, 2017.

ZHANG, M. *et al.* Proteomic analysis reveals proteins and pathways associated with lactation in exosomes derived from bovine mammary epithelial cells. Journal of Proteome Research, v. 19, n. 8, p. 3211–3219, 2020.

WANG, Yiming; NI, Heyu. Fibronectin maintains the balance between hemostasis and thrombosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 16, p. 3265–3277, 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2225-y.

GUO, Jiayu; WANG, Yan; LIANG, Haihai; YANG, Baofeng. Small leucine rich proteoglycan in fibrotic diseases: new frenemies? *International Journal of Drug Discovery and Pharmacology*, v. 1, p. 61–78, 2023. DOI: 10.53941/ijddp.2023.100005.

UDDIN, Fathema; RUDIN, Charles; SEN, Triparna. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387.

LINGASAMY, P.; TOBI, A.; KURM, K.; et al. Targeting oncofetal fibronectin and neuropilin-1 in solid tumors with PL2 peptide. *Scientific Reports*, v. 15, p. 29369, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-11299-x.

MARTINS, Leonardo Tondello et al. *Production of recombinant therapeutic proteins in genetically engineered animals: the dawn of a new era*. 2015**.**

MEIRELLES, Fábio V. et al. Produção de pró-insulina humana no leite de vacas transgênicas. *Biotechnology Journal*, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 230–240, 2024. Disponível em: <https://www.biotechnology-journal.com/\>. Acesso em: 12 set. 2025.

DU, Miao et al. Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technologies. Frontiers in bioengineering and biotechnology , v. 10, p. 1028691, 2022.

RAN, F. Ann et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. Nature, v. 520, n. 7546, p. 186-191, 2015.

TRASANIDOU, Despoina et al. Efficient genome and base editing in human cells using ThermoCas9. The CRISPR Journal, v. 6, n. 3, p. 278-288, 2023.

GUO, Tao et al. Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Genome biology, v. 19, n. 1, p. 170, 2018.

ZHANG, JP, Li XL, Li GH, Chen W, Arakaki C, Botimer GD, Baylink D, Zhang L, Wen W, Fu YW, Xu J, Chun N, Yuan W, Cheng T, Zhang XB. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. Genome Biol. 2017 Feb 20;18(1):35. doi: 10.1186/s13059-017-1164-8. Erratum in: Genome Biol. 2025 May 27;26(1):143. doi: 10.1186/s13059-025-03629-z. PMID: 28219395; PMCID: PMC5319046.

PAQUET, Dominik et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. Nature, v. 533, n. 7601, p. 125-129, 2016.

QUADROS, Rolen M. et al. Easi-CRISPR: um método robusto para geração em uma etapa de camundongos portadores de alelos condicionais e de inserção usando doadores de ssDNA longo e ribonucleoproteínas CRISPR. Genome biology , v. 18, n. 1, p. 92, 2017.

SUN, Tao et al. Eliminação funcional de FUT8 em células de ovário de hamster chinês usando CRISPR/Cas9 para produzir um anticorpo defucosilado. Engenharia em Ciências da Vida , v. 15, n. 6, p. 660-666, 2015.

LI, Dongxu et al. Genetically Engineered Goats as Efficient Mammary Gland Bioreactors for Production of Recombinant Human Neutrophil Peptide 1 Using CRISPR/Cas9. Biology, v. 13, n. 6, p. 367, 2024.

YU Z, Shi J, Zhang J, Wu Y, Shen R, Fei J. Comparative study on the expression characteristics of transgenes inserted into the *Gt(ROSA)26Sor* and *H11* loci in mice. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2024 May 15;56(11):1687-1698. doi: 10.3724/abbs.2024081. PMID: 38752269; PMCID: PMC11693873.

WANG, Ming et al. Efficient targeted integration into the bovine Rosa26 locus using TALENs. Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 10385, 2018.

WU M, Wei C, Lian Z, Liu R, Zhu C, Wang H, Cao J, Shen Y, Zhao F, Zhang L, Mu Z, Wang Y, Wang X, Du L, Wang C. Rosa26-targeted sheep gene knock-in via CRISPR-Cas9 system. Sci Rep. 2016 Apr 11;6:24360. doi: 10.1038/srep24360. PMID: 27063570; PMCID: PMC4827023.

ZHANG Z, Chen D, Lu X, Zhao R, Chen Z, Li M, Xu T, Mao Y, Yang Y, Yang Z. Directed Expression of Tracheal Antimicrobial Peptide as a Treatment for Bovine-Associated *Staphylococcus Aureus*-Induced Mastitis in Mice. Front Vet Sci. 2021 Oct 4;8:700930. doi: 10.3389/fvets.2021.700930. PMID: 34671659; PMCID: PMC8520960.

ZHI DF, Wang B, Cui SH, Yang BL, Zhao BD, Zhao YN, Jiang YX, Yu SJ, Zhang SB. [Comparison of two kinds of cationic vectors-mediated gene delivery]. Yao Xue Xue Bao. 2009 May;44(5):553-7. Chinese. PMID: 19618735.

WANG, Chenfei et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. Journal of nanobiotechnology, v. 21, n. 1, p. 272, 2023.

POTTER, Huntington; HELLER, Richard. Transfecção por eletroporação. Protocolos atuais em biologia molecular , v. 121, n. 1, p. 9.3. 1-9.3. 13, 2018.

LV, H.; ZHANG, S.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 100–109, 10 ago. 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014.

KIM, S.; KIM, D.; CHO, S. W.; KIM, J.; KIM, J.-**S.** Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 6, p. 1012–1019, jun. 2014. DOI: https://doi.org/10.1101/gr.171322.113.

YU, X.; LIANG, X.; XIE, H. et al. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 38, p. 919–929, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/s10529-016-2064-9.