

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS- CCTA

ALINNE GLORIA CURCIO

ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRANSGÊNICAS
PARA SEREM UTILIZADAS COMO DOADORAS DE NÚCLEO NA PRODUÇÃO DE BOVINOS
TRANSGÊNICOS

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2014

ALINNE GLORIA CURCIO

ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRANSGÊNICAS
PARA SEREM UTILIZADAS COMO DOADORAS DE NÚCLEO NA PRODUÇÃO DE BOVINOS
TRANSGÊNICOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal com ênfase em Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADOR Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias

CO-ORIENTADOR: Álvaro Fabrício Lopes Rios

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2014

ALINNE GLORIA CURCIO

ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRANSGÊNICAS
PARA SEREM UTILIZADAS COMO DOADORAS DE NÚCLEO NA PRODUÇÃO DE BOVINOS
TRANSGÊNICOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal com ênfase em Biotecnologia da Reprodução.

Apresentado 24 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINATÓRIA

Prof.Orientador Ângelo José Burla Dias (Doutor em Biociências e Biotecnologia – UENF)

Prof. Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor em Ciências Biológicas/Genética)

Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora em fisiologia da Reprodução – UENF)

Fabiana Fernandes Bressan (Doutora em Ciências – USP)

Agradecimentos

À Deus pelo sustento

Aos meus pais Gilna e Adeilson e ao meu noivo Bruno, pelo amor, força e paciência;

Ao meu professor, orientador e amigo Ângelo Burla, pelo incentivo para sempre prosseguir e por me fazer acreditar mais em mim;

À equipe de trabalho do LRMGA, em especial as técnicas Carla e Bruna, pela cooperação direta e ensinamentos;

Ao professor Álvaro Fabrício Lopes Rios e a aluna Paula Magnelli pelo apoio;

À Dr. Fabiana Bressan e Dr. Flávio Meirelles por contribuírem diretamente para a realização desta pesquisa e pelo apoio científico sem os quais tal experimento não seria possível.

À Juliana pela disponibilidade e simpatia e auxílio nas análises por citometria;

À Dr. Célia Raquel Quirino pelo auxílio na análise dos resultados deste experimento;

Às minhas amigas Janaina Leite e Fernanda Bastos por terem vindo comigo até aqui. Espero que seja assim para toda vida;

Aos amigos de batalha, Laura, Diego Dubeibe, Valter Maciel, Maurício Mongollon, Gester, Kellen, Jaciara, Nathália, por todas as conversas e discussões de cunho científico ou não, que muito alegram nossos dias;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense pela oportunidade de realizar esse trabalho;

À USP-Pirassununga pela hospitalidade e oportunidade de aprendizado.

A FAPERJ pelo apoio financeiro;

Resumo

Este trabalho teve por objetivo estabelecer o tipo celular mais adequado para integração do transgene, *Green Fluorescent Protein* (GFP), derivada do plasmídeo pEGFPN2 ou do plasmídeo FUGW quando modificadas geneticamente por transdução lentiviral ou por lipofecção. Para tal, inicialmente foi avaliada a possibilidade de utilização do reagente K2 em comparação com a Lipofectamina 2000, para a transfecção das células 293. Em seguida foi avaliada a porcentagem de células positivas e os níveis de expressão da proteína verde fluorescente (GFP) nos diferentes tipos celulares [(fibroblastos fetais (FF), adultos (FA) e células do *cumulus* (CC)] transfectados por transdução lentiviral ou por lipofecção (lipofectamina 2000 ou K2) utilizando os plasmídeos pEGFPN₂ ou o plasmídeo FUGW. As análises dos experimentos anteriormente citados foram realizadas por citometria de fluxo avaliando a porcentagem e intensidade de fluorescência emitida pelas células. Por último foi avaliado o aspecto morfológico por microscopia óptica dos tipos celulares submetidos os transdução lentiviral ou por lipofecção. A transdução lentiviral resultou em melhores taxas de incorporação gênica independente do tipo celular utilizado (FF 88,8 % \pm 0,98;, FA 91,6 % \pm 2,96 e CC 60,7 \pm 14.7), porém a lipofecção por Lipofectamina 2000 mostrou-se o segundo método mais eficiente de transfecção (FF 17,8 \pm 2,82; FA: 10,66 \pm 0,65 e CC 3,9 \pm 1,97), sendo desta forma uma boa alternativa para a produção de células bovinas transgênicas. Com relação ao tipo celular, as células adultas apresentaram os melhores índices expressão do transgene quando a transdução lentiviral (FA: 7957.5 \pm 1120 e CC: 6020.5 \pm 310,42) ou a lipofecção (FA: 9367.5 \pm 3490.9 e CG 3496 \pm 2638.92) foi utilizada. A eficiência da transferência gênica foi relacionada ao método de transfecção e ao tipo celular utilizado, mas melhores resultados de expressão gênica foram obtidos com células adultas.

Palavras chaves: GFP, transgenia e modificação genética.

Abstract

This work was designed to establish the most appropriate cell type for incorporation of transgene, Green Fluorescent Protein (GFP), derived from pEGFPN2 or FUGW plasmid, when genetically modified by lentiviral transduction or lipofection. For this purpose, initially the possibility of using of K2 reagent compared with Lipofectamine 2000 for 293 cells transfection have been evaluated. Then the transfection efficiency and expression levels of green fluorescent protein (GFP) have been assessed in different cells types [fetal (FF) and adults fibroblasts (FA) and cumulus cells (CC)] genetically modified by lentiviral transduction or lipofection (lipofectamine 2000 or K2) using the pEGFPN2 or FUGW plasmid. The experiments described previously were analyzed by flow cytometry to evaluate the rate and intensity of fluorescence emitted by the transgenic cells. Finally, the morphological appearance has been evaluated by optical microscopy of cell types which undergo the lentiviral transduction or by lipofection. The lentiviral transduction resulted in better rates of gene incorporation regardless of the cell type used (FF $88.8 \% \pm 0.98$, FA $91.6 \pm 2.96 \%$ and CC 60.7 ± 14.7), on the other hand the lipofection using Lipofectamine 2000 was the second most efficient transfection method (FF 17.8 ± 2.82 ; FA: 10.66 ± 0.65 and 3.9 ± 1.97 CC), thus being a good alternative for the production of transgenic bovine cells. Regarding the cell type, adult cells presented the best transgene expression when lentiviral transduction (FA: 7957.5 ± 1120 and CC : 6020.5 ± 310.42) or lipofection (FA: 9367.5 ± 3490.9 2638.92 ± 3496 and GC) was used. The gene transfer efficiency was related to the method of transfection and the cell type used, but better gene expression results were obtained with adult cells.

Key Word: GFP, transgene, genetic modification.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	07
2. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1: PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS.....	11
3.2: CULTIVO CELULAR PARA PRODUÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS PARA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR.....	13
3.3: INTRODUÇÃO DE DNA EM CÉLULAS MAMÍFERAS.....	16
3.4: UTILIZAÇÃO DA GFP COMO MARCADOR PARA A INCORPORAÇÃO DO TRANSGENE	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1: ISOLAMENTO E CULTIVO DOS DIFERENTES TIPOS CELULARES.....	22
4.2: TRIPSINIZAÇÃO E CONGELAMENTO DAS CÉLULAS.....	23
4.3: TRANFEÇÃO E TRANSDUÇÃO.....	24
4.4: ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	29
4.4: AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA.....	29
4.4: ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

O termo transgênico refere-se a organismos que, por ação humana, tenham uma sequência de DNA exógena permanentemente inserida em seu genoma de maneira que seja transmitida a gerações futuras.

A transgênese na área animal possui várias aplicações sendo as de maior interesse a produção de animais produtores de biofármacos ou biocompostos, produção de animais para serem utilizados como modelos para estudos de doenças, principalmente de humanos, produção de órgãos para xenotransplantes e ainda a produção de animais pecuários com alto valor genético associado (BACCI, 2007).

Dentre as principais técnicas utilizadas para produção de animais transgênicos podem ser citadas a injeção pró-nuclear de DNA (ITTNER e GÖTZ 2007), a fecundação de ovócitos com sêmen previamente incubado com DNA exógeno (SMITH e SPADAFORA, 2005), o transplante de células tronco germinativas para as gônadas masculinas (HONARAMOOZ *et al.*, 2002), a introdução de células tronco embrionárias no interior de blastocistos em desenvolvimento (SHIM *et al.*, 1997) e a transferência nuclear (TN) de núcleo células somáticas (PARK *et al.*, 2002; HYUN, 2003; ALONSO-GONZÁLEZ, 2012).

Apesar desta disponibilidade de técnicas, a produção de animais transgênicos ainda pode ser considerada uma biotecnologia cara e laboriosa devido a sua baixa eficiência. Na injeção pró-nuclear, por exemplo, a técnica mais utilizada durante anos, a eficiência é de aproximadamente apenas 5% em camundongos, apresentando índices ainda menores em animais de produção (COLARES, 2005).

O desenvolvimento da técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ou simplesmente transferência nuclear (TN) (WILLMUT *et al.*, 1996), proporcionou uma série de avanços quando comparado a metodologias anteriormente utilizadas para a produção de animais transgênicos, devido a possibilidade de cultivo celular, transferência do gene de interesse e seleção das células antes do seu uso como doadoras de núcleo na TN (BRESSAN *et al.*, 2008)

Na TN, o ooplasto receptor deve ser capaz de suportar o desenvolvimento embrionário, enquanto a célula doadora de núcleo deve ser permissiva a totipotência,

além de incorporar e permitir a expressão adequada da sequência de DNA exógena (HOUDEBINE, 2004).

Durante muitos anos os fibroblastos fetais foram o tipo celular mais utilizado na produção de bovinos transgênicos por transferência nuclear, mas hoje diferentes tipos celulares têm sido utilizados com diferentes taxas de eficiência (BHOJWANI *et al* 2005; ARAT *et al.*, 2001, CHO *et al.*, 2004). O uso de tipos celulares alternativos justifica-se devido a sua facilidade de obtenção e cultivo em um laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos o que apresentaria certa vantagem com relação às células fetais comumente usadas. Além disso, o uso de células adultas pode ser mais apropriado quando comparado às células fetais, pois neste caso, tanto o genótipo, quanto o fenótipo do animal é conhecido.

Diferentes métodos de transfecção estão disponíveis para a produção de células transgênicas para a utilização na TN, com diferentes taxas de eficiência e período de expressão do gene de interesse. Dentre os mais comumente utilizados encontram-se os protocolos que utilizam reagentes tais como fosfato de cálcio (KWON *et al.*, 2013) ou diethylaminoethyl (DEAE)-dextran (ESHITA *et al.*, 2011), a eletroporação (KANG *et al.*, 2009), a lipofecção (HYUN *et al.*, 2003) e a transdução utilizando vetores virais ([KUES](#) e [NIEMANN](#), 2011).

Utilizando as diferentes técnicas de transfecção (exceto a transdução viral), uma vez no interior da célula a integração do inserto ao DNA cromossomal ocorre de maneira espontânea, porém trata-se de um processo raro e a integração ocorre de forma randômica (KERAVALA e CALOS, 2007), fator que pode contribuir para a baixa eficiência de produção e baixa expressão do transgene na progênie.

A utilização de vetores virais poderia ser uma alternativa para solucionar o problema, mas o seu uso ainda é limitado devido a questões de biossegurança, pois apesar do desenvolvimento de vetores seguros, poderiam ocorrer mutações que ocasionassem o retorno da virulência e a possibilidade de infecção do manipulador ([KUES](#) e [NIEMANN](#), 2011). Estas considerações têm estimulado a padronização e a utilização de métodos não virais para a transferência de genes para a produção de células transgênicas.

Tendo em vista a (i) necessidade do desenvolvimento de sistemas de cultivos celulares eficientes para a produção de células doadoras de núcleo para a

transferência nuclear; (ii) a importância do uso de diferentes tipos celulares para a produção de animais transgênicos; (iii) que o padrão e o nível de expressão do transgene pode variar de acordo com o tipo celular (iv) a necessidade de estabelecimento de um método de transfecção adequado, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito do método de transfecção e do tipo celular, sobre a eficiência da incorporação e da expressão gênica, em bovinos.

2. OBJETIVOS

2.1: OBJETIVO GERAL

Estabelecer o tipo celular mais adequado para incorporação do transgene GFP derivada do plasmídeo pEGFPN₂ ou do plasmídeo FUGW quando modificadas geneticamente por transdução lentiviral ou por lipofecção.

2.2: OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1: Analisar o efeito de dois reagentes de lipofecção (Lipofectamina 2000[®] ou K2[®]) na transfecção da linhagem celular 293 produtora de lentivirus.

2.2.3: Comparar a porcentagem de transfecção nos tipos celulares modificados geneticamente por transdução lentiviral ou por lipofecção (Lipofectamina 2000[®] ou K2[®]) utilizando o plasmídeo pEGFPN₂ e o plasmídeo FUGW.

2.2.2: Comparar a intensidade de fluorescência da proteína GFP nos diferentes tipos celulares geneticamente por transdução lentiviral ou por lipofecção (Lipofectamina 2000[®] ou K2[®]), utilizando o plasmídeo pEGFPN₂ e o plasmídeo FUGW.

2.2.2: Analisar o aspecto morfológico tipos celulares modificados geneticamente por transdução lentiviral ou por lipofecção (Lipofectamina 2000[®] ou K2[®]) utilizando o plasmídeo pEGFPN₂ e o pFUGW.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1: PRODUÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

O termo transgênese refere-se a habilidade de introduzir genes exógenos em células vivas, e é uma das mais atuais e poderosas ferramentas para estudo de complexos processos biológicos (BRESSAN *et al.*, 2008;). A esses organismos que tenham sua sequência de DNA alterada pela ação humana dá-se o nome de organismos geneticamente modificados (OGM's) (SUN *et al.*, 2010; [KUES](#) e [NIEMANN](#), 2011).

O marco inicial da transgênese ocorreu em 1973 com a produção da bactéria *Escherichia coli* geneticamente modificada (COHEN *et al.*, 1973). Com relação à transgênese animal, o camundongo foi o primeiro animal utilizado. Em 1980, Gordon *et al.* reportaram a criação do primeiro camundongo geneticamente modificado utilizando a técnica da injeção pronuclear de DNA. Tais autores introduziram também a partir daí, o termo “transgênese”, que passou a ser amplamente utilizado para denominar tais indivíduos que traziam sequências de DNA exógenas em seu genoma (GORDON *et al.*, 1980).

Atualmente há relatos de produção de animais transgênicos de diferentes espécies: bovinos (ROH *et al.*, 2000; ARAT *et al.*, 2002), equinos ([PEREYRA-BONNE](#) *et al.*, 2008) suínos (PARK *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2009), ovinos (RITCHIE, 2009), primatas (MENG *et al.*, 1997), dentre outras.

Até a criação da transferência nuclear de células somáticas em 1996, a injeção pronuclear de DNA foi o método mais utilizado para a produção de animais transgênicos, apesar da baixa eficiência da técnica, que constitui um fator limitante para a sua utilização principalmente em animais de produção, nos quais a eficiência de transgenia na progênie é ainda menor do que em camundongos (COLARES, 2012).

O interesse pela introdução de genes exógenos em células vivas está geralmente relacionado a questões de saúde humana ou a produção de animais com características superiores. Uma das maiores contribuições da transgênese foi a

produção de proteínas recombinantes a partir de bactérias transgênicas. Porém sabe-se que uso deste sistema é limitado devido ao fato das bactérias não serem capazes de sintetizar proteínas mais complexas e em grandes quantidades (BACCI, 2007).

Por isso, nos últimos anos houve um aumento no interesse pela produção de animais transgênicos, principalmente devido a sua utilização como biorreatores, produzindo em larga escala e com baixo custo, substâncias de interesse para a medicina (GAMA ROSA, *et al.*, 2010; HOUDEBINE, 2009). Utilizando as estratégias de biotecnologia a produção de biofármacos poderia ser direcionada via promotores tecido-específicos para outros fluidos biológicos, porém devido a quantidade e a qualidade da proteína produzida, o leite tem sido o meio de produção preferencialmente utilizado para a produção de biofármacos/bioproductos. Estima-se que a cada litro de leite, 2g de proteína de interesse seja produzida, o que representa um aumento da eficiência e conseqüente redução dos custos de produção. Além disto, o biofármaco produzido por tal sistema apresenta melhor efeito biológico quando comparado à aqueles produzidos pelo métodos tradicionais, anteriormente utilizados (VAN BERKEL *et al.*, 2002).

Os animais transgênicos são essenciais para os estudos relacionados a função e expressão gênica, sendo também utilizados como modelos de estudo de doenças raras e graves em humanos (KRAGH *et al.*, 2009; JACOBSEN *et al.*, 2010). Além disso, é importante ressaltar que a transgênese pode ser uma técnica de melhoramento genético e tem sido utilizada para tal fim levando a produção de animais com características de produção superiores (qualidade e composição do leite, qualidade de carne, carcaça e lã, resistência a doenças, dentre outras) e por isso, com elevado potencial econômico (BACCI, 2007).

3.2: CULTIVO CELULAR PARA PRODUÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS PARA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

O primeiro cultivo celular foi realizado há mais de 100 anos por Granviele Harrison, um biólogo embriologista, com o objetivo de estudar o desenvolvimento de uma célula nervosa. Desde então, os cultivos celulares têm apresentado relevante contribuição para a ciência. São usados para entender muitos processos biológicos, na produção de células com fins terapêuticos, para serem aplicadas na reposição de

tecidos em indivíduos; para entender muitos fenômenos relacionados a neoplasias; no diagnóstico virológico e produção de vacinas em ensaios imunológicos; na indústria cosmética e farmacológica e mais recentemente em experimentos de clonagem e transgenia (PERES e CURI, 2005).

Para a produção de animais transgênicos por TN as células podem ser cultivadas *in vitro* por várias gerações, transfectadas e selecionadas quanto a integração do DNA exógeno. Isto pode não somente garantir a presença da construção gênica na prole, como também pode evitar a produção de animais portadores de modificações genéticas indesejáveis resultantes da inserção aleatória do gene em regiões codificantes do genoma (BRESSAN *et al.*, 2008).

Nos primeiros experimentos de transferência nuclear realizados, células tronco embrionárias (CTEs) não modificadas foram utilizadas como células doadoras de núcleo, principalmente devido ao fato de relacionarem a pluripotencialidade ao sucesso da reprogramação nuclear (CAMPBELL *et al.*, 1996; BRESSAN *et al.*, 2008). As células tronco embrionárias são células pluripotentes, obtidas de embriões no estágio de mórula ou blastocisto e tem a capacidade dar origem a qualquer tecido do embrionário (HYTTEL *et al.*, 2012). Em camundongos o uso de células tronco embrionárias é uma boa opção para a produção de indivíduos geneticamente modificados, porém sua utilização na produção de animais transgênicos não está totalmente elucidada (MUNÓZ *et al.*, 2008).

O nascimento da ovelha Dolly em 1996, após a TN de uma célula adulta diferenciada (célula da glândula mamária) para um ovócito enucleado, confirmou as especulações da época de que mesmo após ter alcançado um determinado estágio de diferenciação, as células poderiam ser reprogramadas, de forma que a totipotência poderia ser novamente alcançada. Tal fato demonstrou ser possível a utilização de células adultas como doadoras de núcleo para a produção de clones, visto que tais células mantêm sua totipotência nuclear (WILLMUT *et al.*, 1996).

As células embrionárias são capazes de gerar tanto o embrião, bem como os tecidos extra-embrionários, fenômeno conhecido como totipotência celular. Por sua vez, as células somáticas diferenciadas guardam a totipotência genômica, ou seja quando induzidas, são capazes dar origem a qualquer tecido e dar origem a um indivíduo quando auxiliadas pelo aparato citoplasmático (HYTTEL *et al.*, 2012).

Assim, a possibilidade de utilização de outros tipos celulares começou a ser investigada, tanto para produção de clones bem, como para a produção de bovinos transgênicos por TN. Em 1998, Kato et al, relataram o nascimento de oito fêmeas bovinas produzidas por TN de células da granulosa e células epiteliais do oviduto, obtidas de um animal adulto. Em 2000 estes mesmos autores reportaram o nascimento de clones a partir de uma variedade de tipos celulares adultos (células da granulosa, oviduto, células uterinas) de fêmeas e de células da pele e da orelha de machos bovinos.

Arat et al. (2001) demonstraram a possibilidade do uso das células da granulosa para a produção de bovinos transgênicos. Tais autores avaliaram também o efeito da manipulação genética, da restrição de soro fetal bovino nos meios de cultivo e do número de passagens celulares, e concluíram que as células da granulosa que sofreram um maior número de passagens (15 passagens) levaram a uma maior produção de blastocistos transgênicos.

Em 2004, Guochun et al. avaliaram a possibilidade do uso de tipos celulares alternativos para a produção de bovinos transgênicos por TN e constataram que as células da granulosa e as células fetais epiteliais do oviduto apresentaram melhores taxas de produção de blastocistos transgênicos quando comparado aos fibroblastos fetais.

Cho *et al* (2004) avaliaram do tipo celular (fibroblastos fetal e adulto e células do *cumulus*), tamanho celular e número de passagens no desenvolvimento de embriões bovinos transgênicos após a TN e na expressão da eGFP. Esses autores observaram que a taxa de desenvolvimento e a expressão de eGFP foi superior com o uso células da granulosa de menor tamanho e de passagens iniciais. Segundo esses autores, essas células permitem uma melhor interação nucleocitoplasmática com o ooplasto receptor, enquanto que as células de menor tamanho encontram-se em sua maioria na fase G0/G1 do ciclo celular, as quais são mais eficientes para suportar o desenvolvimento embrionário. Com relação ao número de passagens os autores atribuem os resultados a possíveis alterações genéticas e epigenéticas em cultivos prolongados.

Apesar destes achados, os fibroblastos fetais ainda são o tipo celular mais utilizado para a produção de bovinos transgênicos por TN. Tal fato pode ser atribuído a

facilidade de obtenção e cultivo *in vitro* e ao fato de sofrerem inúmeras divisões celulares antes de alcançarem a senescência. Esta preferência pode ainda ser ocasionada devido ao fato de alguns pesquisadores relacionam o insucesso na reprogramação nuclear a utilização de células somáticas adultas como doadoras de núcleo. Porém outros fatores tais como, o tipo e ciclo celular, o número de passagem e o doador das células parecem estar envolvidos neste processo (ERIGHT et al., 2003; POWELL et al., 2004;).

No entanto, o uso de células adultas para a produção de animais transgênicos por transferência nuclear pode ser mais apropriado do que o uso de células embrionárias ou fetais, pois tanto o genótipo, quanto o fenótipo do animal é conhecido (GUOCHUN *et al.*, 2004).

A grande variação dos resultados ainda persiste em decorrência do grande número de etapas (cultivo, transfecção e seleção da célula doadora de núcleo, maturação e enucleação oocitárias, fusão da célula doadora com o ooplasto receptor, ativação para o desenvolvimento embrionário e cultivo *in vitro*) relacionadas ao processo de produção de animais transgênicos por transferência nuclear, executadas de maneira diferente por cada equipe de trabalho.

A Lipofectamina 2000® é um reagente lipídico de transfecção altamente difundido e recomendado pelo fabricante do kit de produção do lentivirus e que tem sido utilizado há mais de 20 anos para a introdução de moléculas de DNA, RNA e RNAi em uma variedade de células mamíferas.

O kit de transfecção K2 Transfection System® é uma metodologia de lipofecção de células humanas ainda pouco utilizada até o momento. É constituído pelo reagente de transfecção, o *K2 transfection* propriamente dito, além do reagente *K₂ multiplier*, que segundo o fabricante (Biotex), diminui a capacidade da célula de detectar o DNA exógeno, aumentando assim a eficiência de transfecção.

3.3: INTRODUÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

As técnicas disponíveis para a introdução intencional de ácido nucleicos em células dá-se o nome de métodos de transfecção as quais influenciam grandemente os resultados de incorporação e expressão do transgene.

Os métodos de transfecção podem ser classificados em dois tipos básicos segundo o período que o transgene é expresso na célula hospedeira: transfecção transiente ou transfecção estável/permanente. Na transfecção transiente, a transcrição ou replicação do transgene pode ser analisada somente por um pequeno espaço de tempo (aproximadamente 1 a 4 dias), devido ao fato do DNA não ter sido incorporado ao DNA cromossomal. No entanto, a produção de animais transgênicos, requer a produção de uma linhagem celular, que contenha o gene permanentemente integrado ao DNA da célula hospedeira ou mantido em um episomo. Este tipo de transfecção é chamada de transfecção estável ou permanente (HOUDEBINE, 2004)

Uma variedade de técnicas está disponível para a introdução de moléculas de DNA em células mamíferas, cada uma com suas vantagens e desvantagens, necessitando de mais estudos para resolução dos problemas técnicos e de segurança envolvidos. A eletroporação, a transfecção usando fosfato de cálcio ou diethylaminoethyl (DEAE)-dextran, a transdução utilizando vetor viral, a nucleofecção e a lipofecção são alguns exemplos de métodos mais utilizados para a introdução de DNA em células mamíferas.

A eletroporação pode ser definida como uso de altas voltagens capaz de induzir a criação de poros transitórios na célula, para introdução uma dada molécula de interesse, neste caso o DNA. O uso da eletroporação pode produzir tanto transfecções estáveis como também a expressão transitória do gene de interesse. Teoricamente, a transfecção por eletroporação independe do tipo celular, assim todos os tipos celulares poderiam ser utilizados, desde que os parâmetros de amplitude e duração do pulso fossem ajustados para cada tipo celular. Uma desvantagem de sua utilização deve-se ao fato de que a eletroporação pode produzir alta taxa de mortalidade celular, além disso, os protocolos apresentam baixa reprodutibilidade, fatores que podem limitar seu uso (EAR *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2009)

A coprecipitação utilizando o fosfato de cálcio atua mediante a formação de um precipitado que contém o DNA plasmidial que adere a superfície da célula e é endocitado por meio de mecanismos ainda não compreendidos. Acredita-se que cerca de 10% das células submetidas a este protocolo são transfectadas, dependendo do tipo celular utilizado. Um fator limitante para o seu uso é a baixa reprodutibilidade do

protocolo, que é extremamente dependente da faixa de pH do sistema ([KWON](#) e [FIRESTEIN](#), 2013).

A transfecção utilizando diethylaminoethyl (DEAE)-dextran pode ser considerada uma alternativa em muitas circunstâncias. Dentre as vantagens de sua utilização destacam-se a relativa simplicidade, rapidez, baixo custo e elevada reprodutibilidade dos protocolos de transfecção. As desvantagens incluem a inibição do crescimento celular e a possibilidade de indução de mudanças morfológicas na célula. Além disso, a redução das concentrações de soro fetal necessária durante a transfecção pode ser incompatível com algumas condições de cultivo de alguns tipos celulares. Em geral, o seu uso é apropriado em transfecções transientes para análises de promotores ou de genes repórteres ([SCHENBORN](#) e [GOIFFON](#), 2000; ESHITA *et al.*, 2011).

A nucleofecção é um método novo, rápido e muito eficiente de transfecção de células vivas. Consiste na utilização do reagente nucleofector em conjunto com a técnica de eletroporação. Diferentemente do que ocorre com os demais métodos de transfecção, a entrada do DNA no núcleo da célula independe do momento do ciclo celular, fator ao qual pode ser atribuído o aumento da eficiência de transfecção quando este método é utilizado. Além disso, constitui uma alternativa para a transfecção de células que não se dividam, tais como os neurônios, por exemplo ([DISTLER *et al.*](#), 2005).

A transfecção utilizando vetores virais constitui uma importante ferramenta para a introdução de DNA em células mamíferas devido ao fato da partícula viral usar seus próprios mecanismos de infecção para entrar na célula (adsorção) e integrar o DNA de interesse ao genoma hospedeiro de forma eficiente, estável e duradora. O sistema viral é atrativo, pois é possível substituir genes ligados a replicação e a virulência por genes de interesse que serão introduzidos no genoma da célula alvo ([KUES](#) E [NIEMANN](#), 2011).

Os lentivirus possuem uma característica única entre os retrovírus, a capacidade de replicação em células que não estejam em divisão, transportando seu material genético de forma ativa para o interior do núcleo, independente do momento do ciclo celular, o que os torna um dos mais eficientes métodos de transferência gênica para células. A utilização dos lentivirus resulta na produção de animais

transgênicos com um índice de integração do DNA exógeno ao DNA hospedeiro sem precedentes. Por outro lado, este elevado número de integrações aumenta também as chances de ocorrência dos efeitos deletérios de posicionamento do transgene. Também tem sido descrita uma elevada ocorrência de animais mosaicos produzidos por esse método; assim como a possibilidade de silenciamento do transgene por metilação devido a presença da sequência viral ([KUES](#) E [NIEMANN](#), 2011).

Outra desvantagem da utilização da transfecção retroviral está relacionada à biossegurança, pois os retrovírus são transmissores de importantes doenças e que, apesar das deleções para a redução da virulência serem realizadas para o seu manuseio *in vitro*, mutações poderiam ocorrer levando ao retorno da virulência. Além disso, o trabalho utilizando vetores virais exige um nível de biossegurança adequado, o que pode representar um fator limitante para alguns laboratórios interessados em implementar em sua rotina a produção de animais transgênicos, devido aos custos para o atendimento das normas de biossegurança. Devido a tais limitações o uso da lipofecção para a produção de células transgênicas têm crescido nos últimos anos em muitas espécies ([HYUN et al.](#), 2003; [CHO et al.](#), 2004; [TAKAHASHI et al.](#), 2007).

Em 1978, foi demonstrado pela primeira vez a habilidade dos lipídeos de formar complexos com outras moléculas e transportá-las para dentro das células eucarióticas *in vitro*, levando a síntese da proteína esperada ([OSTRO et al.](#), 1978; [DIMITRIADIS et al.](#), 1978). Tal propriedade pode ser atribuída a uma característica típica dos lipídeos que é a formação de bicamadas fechadas (lipossomos) quando expostos a água devido a sua natureza anfifílica.

A maior parte dos lipídeos comercialmente disponíveis é constituída por uma combinação de polímeros catiônicos e lipídeos neutros, que devido a natureza catiônica tendem a formar complexos com o DNA e transportá-lo para o interior da célula.

Apesar do processo de lipofecção ainda não estar totalmente elucidado, acredita-se que envolva a formação do complexo DNA-lipídeo, a fusão com a membrana e a internalização do complexo lipídico no citoplasma da célula. Finalmente, o DNA deve ser liberado do complexo lipídico para o citoplasma e então o DNA fica dependente de mecanismos celulares para alcançar o núcleo ([MONTIGNY et al.](#), 2003).

Uma vez no citoplasma da célula o DNA exógeno precisa atingir o núcleo, para que ocorra a integração ao DNA cromossomal. A integração ocorre de maneira espontânea, porém trata-se de um processo raro e que ocorre de forma aleatória, o que torna a expressão, quando presente, imprevisível. De acordo com o que tem sido demonstrado por alguns autores esta pode ser uma das principais causas da baixa eficiência da transgênese (KERAVALA e CALOS, 2008).

Uma vez integrado ao DNA genômico a expressão do transgene pode ainda ser influenciada pela sua localização, ou seja, seu posicionamento em relação a elementos de controle transcricional, regiões de heterocromatina não transcritas dos cromossomos, além de outras regiões silenciadas, podendo levar ao efeito de *knock-out* não intencional (BRESSAN et al., 2008).

3.3: UTILIZAÇÃO DA GFP COMO MARCADOR PARA A INCORPORAÇÃO DO TRANSGENE

A proteína verde fluorescente do inglês *Green Fluorescent Protein* (GFP) é um polipeptídeo de 27 KDa, com fluorescência espontânea, derivada do [cnidário *Aequorea victoria*](#), que absorve luz ultravioleta e emite luz esverdeada quando exposta a mesma. Desde seu isolamento, esforços foram realizados no intuito de aumentar os níveis de expressão e fluorescência, fato que foi conseguido por meio de mutações na sequência dos cromóforos passando assim a ser chamada de *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (COELHO, 2002).

A GFP, bem como outras proteínas fluorescentes, apresenta um grande potencial para ser usada na produção de indivíduos transgênicos por se tratar de um marcador de eficiência que não ocasiona nenhum efeito biológico e não necessita de nenhum substrato adicional para o seu uso. Por tratar-se de gene repórter, a sequência gênica codificante tem sido introduzida em muitos plasmídeos para auxiliar na localização de outras proteínas de interesse, no estudo da expressão de outros genes e para a análise da eficiência de promotores (GUOCHUN *et al.*, 2004). Além disso, as análises quanto a integração do transgene são feitas em tempo real, *in vivo*, com o auxílio de metodologias simples tais como microscopia de fluorescência ou a citometria de fluxo, por exemplo, sendo essas

análises acompanhadas ao longo do desenvolvimento do organismo em questão (RIZZUTO *et al.*, 1996; TAKADA *et al.*, 1997).

Há relatos da produção de muitos animais transgênicos para a GFP tanto para fins comerciais como também para pesquisa, como por exemplo bovinos (ARAT *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2004), suínos (ZHENG *et al.*, 2009) ovinos (GOU *et al.*, 2004) e camundongos (FENG *et al.*, 2000).

Para aumentar a eficiência de seleção das células transgênicas é comum que uma sequência de resistência a um antibiótico (geralmente Neomicina, pEGFPN2) seja acoplada ao plasmídeo que codifica a GFP (pEGFP) com o objetivo de aumentar a eficiência de seleção das células transgênicas. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a seleção por meio de drogas nem sempre é eficiente e que as colônias selecionadas por tal método contêm tanto células transgênicas como não transgênicas (HYUN *et al.*, 2003). Além disto, a seleção por drogas demanda prolongados períodos de cultivo sob elevadas concentrações de antibióticos no meio e o que pode ser prejudicial a qualidade da célula.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados foram provenientes da Sigma Aldrich®, exceto aqueles especificados no texto.

4.1: ISOLAMENTO E CULTIVO DOS DIFERENTES TIPOS CELULARES:

4.1.1: Células do complexo *cumulus oophuros*

Para o cultivo das células do *cumulus*, complexos *cumulus oophuros* (COCs) foram puncionados de ovários provenientes de matadouros da região. As punções foram realizadas com auxílio de uma seringa, acoplada a uma agulha 19G. O líquido folicular contendo os COCs foi levado ao fluxo laminar para que se procedesse a busca e seleção dos mesmos. Os COCs foram classificados em graus I, II, III ou IV de acordo com DE Loss *et al.* (1999). COCs classificados como grau I, II ou III foram transferidos para uma placa de Petri de 30mm contendo meio de cultivo de células [meio 199 com HEPES (M2520), 5% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell), penicilina (100UI/mL) (P3032), estreptomicina (100 µg/mL) (S1277), gentamicina (0,5mg/mL) (G1264)] onde permaneceram por 48 horas, à 38,5 °C e 5 % de CO₂. Em seguida apenas os ovócitos foram removidos da placa. A confluência desejada, de cerca de 80%, foi obtida entre 5 a 7 dias e então a cultura foi tripsinizada para obtenção das células para a transfecção.

4.1.2: Fibroblastos adulto e fetal

Para o isolamento dos fibroblastos adultos, um fragmento de orelha de um bovino abatido em matadouro da região foi utilizado. Já para a obtenção dos fibroblastos fetais, um feto bovino de aproximadamente 60 dias, foi colhido em abatedouro da região e de igual forma um fragmento de pele foi retirado para a realização do cultivo.

Os fragmentos coletados foram lavados em salina estéril acrescida de antibióticos [penicilina (100UI/mL) (P3032), estreptomicina (100 µg/mL) (S1277), e imersos em álcool 70°, por 30 segundos para a redução da carga bacteriana e em seguida lavados com salina. Então se procedeu a retirada de fragmentos do tecido subcutâneo que foram utilizados para o isolamento dos fibroblastos.

Os fragmentos de tecido subcutâneo (2X2 mm, aproximadamente) foram depositados em um Becker com salina estéril acrescida de penicilina (100UI/mL) (P3032) e estreptomicina (100 µg/mL) (S1277), e logo foram transferidos para um tubo cônico de centrífuga de 15 mL contendo 5,0 mL do meio de lavagem de células, onde permaneceram a uma temperatura de 20° C, por um período de 3-4 horas. Posteriormente foi realizada a lavagem dos fragmentos que passaram de forma

sequencial por cinco micro-tubos (1 mL) contendo PBS que foram levados ao agitador de tubos para a limpeza mecânica do material.

Após a lavagem os pequenos fragmentos de subcutâneo foram então colocados em placas de Petri de 30 mm, próximos a borda, e foram levadas a estufa (38,5° C, 5% de CO₂), onde permaneceram por aproximadamente 1 hora para a aderência dos fragmentos ao fundo da placa. Após este período, 3,0 mL do meio de cultivo foi adicionado à placa, que permaneceu na estufa durante tempo necessário para que os fibroblastos começassem a proliferar a partir dos fragmentos de tecido e atingissem a confluência desejada.

4.2: TRIPSINIZAÇÃO E CONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Após atingir a confluência desejada ou sempre que necessário, a passagem celular foi realizada em solução de tripsina 0,25 % (T4799) e EDTA 0,25 % (E5134). Após a segunda passagem, as células foram congeladas em meio 199 suplementado com 20% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e antibióticos (penicilina 100UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL) até o momento das transfecções ou transduções.

4.3: TRANSFECÇÃO E TRANSDUÇÃO

Após o congelamento as células foram transportadas ao Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) /USP- Pirassununga onde foram realizadas as transduções e as transfecções.

Para tal, as células foram descongeladas e transferidas para uma placa de Petri (10 cm) e após atingirem confluência de 80-90% as culturas foram novamente tripsinizadas e transferidas para uma placa de 6 poços ($3,5 \times 10^4$ células/poço) onde as infecções e as transfecções foram realizadas .

No experimento 1 foi avaliada a possibilidade de utilização do reagente de transfecção K2 Transfection System® (Biontexas cód. T0601.5) como reagente alternativo de lipofecção das células 293FT produtoras de lentivirus (Invitrogen cód. R700-07).

As células 293FT (2×10^6 células, Invitrogen) foram plaqueadas em garrafas de cultivo de modo que apresentassem no momento da transfecção a confluência

desejada de 80% e foram transfectadas utilizando 10 μ L Lipofectamina 2000[®] (Controle) ou 10 μ L do reagente de transfecção K2 Transfection System[®] (G1) seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas 5 μ g de cada vetor auxiliar, pLP1, pLP2 e pLP/VSVG (Figura 01), e 10 μ g do plasmídeo FUGW (Figura 02).

Após 24 horas da transfecção as células foram analisadas por citometria de fluxo.

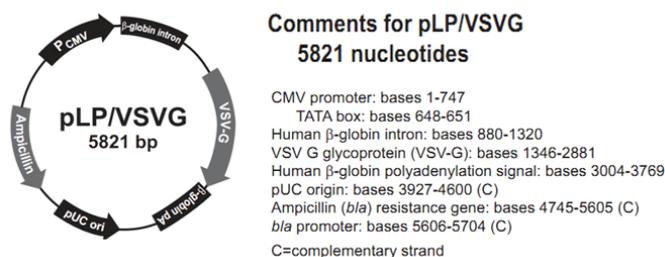
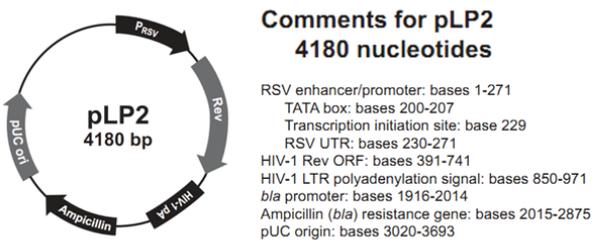
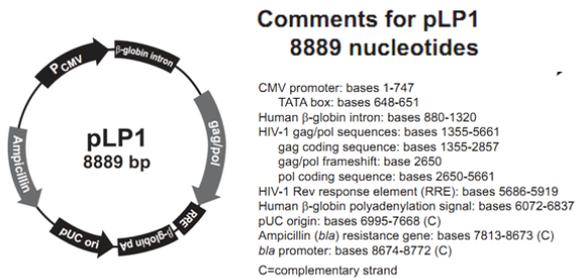
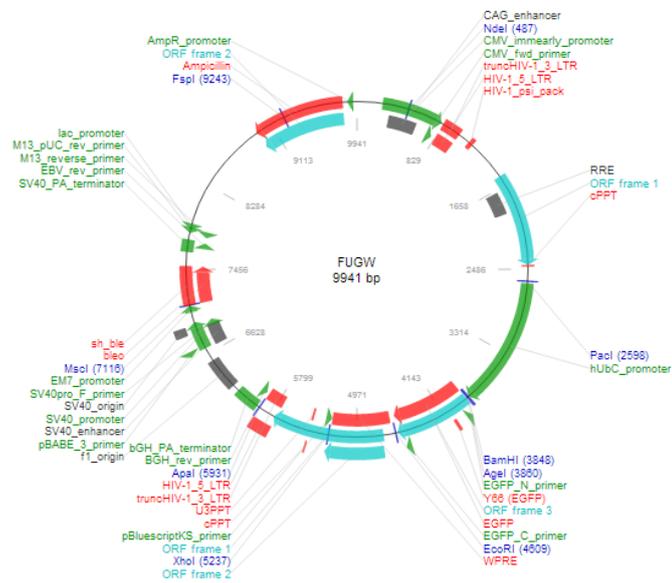


Figura 01: Mapa dos vetores auxiliares para a produção lentiviral. A: pLP1, contendo gag/pol. B: pLP2, contendo Ver. C: pLP/VSVG. Figura adaptada do catálogo *Virapower Lentiviral kit (LifeTechnologies)*.



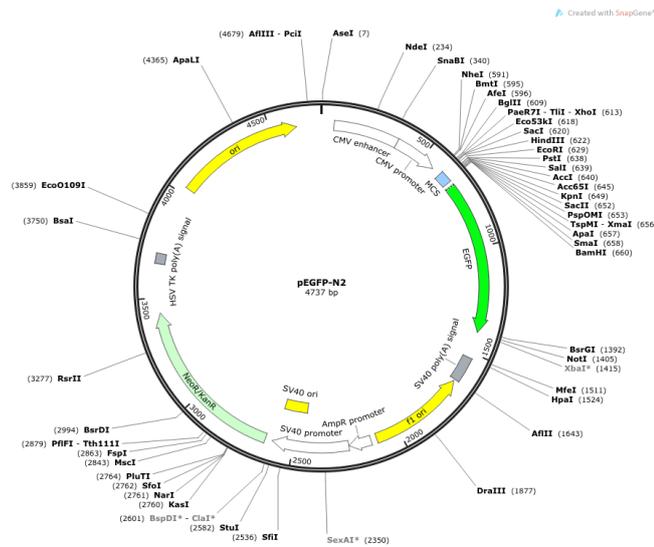


Figura 02: Mapa dos plasmídeos FUGW e pEGFPN₂ .

No experimento 2 foi comparada a eficiência de transfecção entre os tipos celulares (fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa) quando submetidos a diferentes métodos de transfecção (Figura 03), segundo os grupos abaixo:

Grupo 1 (G1): A Lipofectamina 2000® (10 µL/poço) foi utilizada para a lipofecção das células produtoras de lentivírus (293 cells) e estes foram utilizados para a transferência gênica dos diferentes tipos celulares.

G2: No grupo 2, foi testada a eficiência do K2 Transfection System® (10 µL/poço) como reagente de lipofecção das células produtoras de lentivírus (293 cells) e estes foram utilizados para a transferência gênica.

G3: A Lipofectamina 2000® (10 µL/poço) foi utilizada para a transfecção das células (fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa) utilizando o plasmídeo FUGW (1µg/poço);

G4: A Lipofectamina 2000® (10 µL/poço) foi utilizada para a transfecção das células (fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa) utilizando o plasmídeo pEGFPN₂ (1µg/poço) (Figura 02);

G5: O K2 Transfection System® (10 µL/poço) foi utilizado para a transfecção das células (fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa) utilizando o plasmídeo FUGW (1µg/poço);

G6: O K2 Transfection System® (10 µL/poço) foi utilizado para a transfecção das células (fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa) utilizando o plasmídeo pEGFPN₂ (1µg/poço).

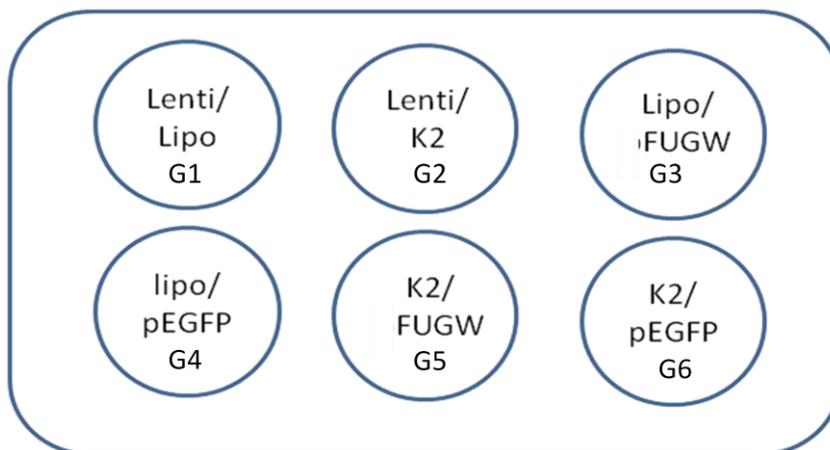


Figura 03: Esquematização dos grupos experimentais dos experimentos 2 e 3.

Para transdução (G1 E G2) foram utilizadas partículas lentivirais construídas por meio do kit *ViraPower Lentiviral Expression System* contendo além dos vetores auxiliares pLP1, pLP2 e pLP/VSVG (5µg/cada) o pFUGW (10 µg) que contém a sequência codificante da proteína GFP.

As partículas lentivirais utilizadas foram produzidas no experimento 1 por lipofecção de células 293FT (Invitrogen) utilizando a Lipofectamina 2000® (G1) (10 µl) o reagente de transfecção o K2 Transfection System® (G2) (10µl). Após 24 e 48 horas da transfecção das células 293FT, o meio de cultivo foi então recolhido e filtrado e depositado sobre os respectivos poços (G1 e G2) contendo os diferentes tipos celulares (1mL/poço).

Os lentivírus utilizados apresentaram, além de uma região codificadora de eGFP, um promotor para a ubiquitinina, uma região HIV flap e a região regulatória pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota (woodchuck hepatitis vírus posttranscriptional regulatory element, WRE) além dos LTRs (*long terminal repeat sequence*). A figura 04 representa a porção do vetor viral que é inserida no genoma-alvo. O lentivirus utilizado não apresenta regiões de replicação, proporcionando a segurança necessária para sua manipulação.

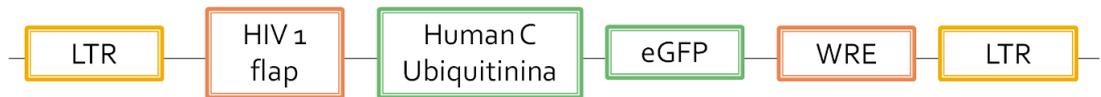


Figura 04: Esquemática da sequência do vetor lentiviral FUGW que é inserida no genoma hospedeiro.

As transfecções (G3-G6) foram realizadas utilizando os dois diferentes reagentes de transfecção: a Lipofectamina 2000® (G3) ou o K2 Transfection System® (G4), seguindo as instruções do fabricante, de modo que cada poço continha 1 µg/poço do plasmídeo FUGW ou do plasmídeo pEGFPN2.

O objetivo do experimento 3 foi comparar o nível de expressão da proteína GFP entre os tipos celulares (fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa) quando submetidos aos mesmos tratamentos do experimento 2 (Figura 03) quando analisados por citometria de fluxo.

4.3 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para as análises por citometria de fluxo o citômetro BD FACSAria e o software FACSDiva foram utilizados. A fluorescência foi excitada com o laser 488nm e lida no filtro 530/30 nm. Os diferentes tipos celulares foram identificados e selecionados dos debris através da análise de tamanho (FSC-H) e por complexidade (SSC-H) e as análises de porcentagem e intensidade de fluorescência foram realizadas (Figura 05).

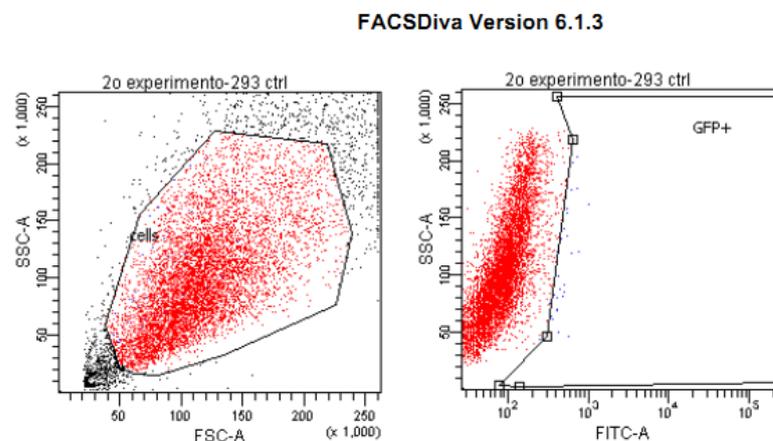


Figura 05: Imagem referente a análise das células 293 por citometria de fluxo (FACSAria, Software: *FACSDIVA*). As células são separadas dos debris através da análise do tamanho (FSC-H) e complexidade (SSC-H).

4.4: AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA

No experimento 4, as células que foram submetidas aos tratamentos dos experimentos 2 e 3 foram analisadas por microscopia ótica de fluorescência (TE 300, Nikon), 24 horas pós-transfecção, com o auxílio do programa de análise de imagens NIS AR 3.1 (Nikon). Os seguintes aspectos morfológicos foram analisados: presença de vacúolos citoplasmáticos, morte celular (células desprendidas) e presença de debris celulares.

4.4: ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a análise de consistência dos dados e estatística descritiva das variáveis (médias, desvio-padrão e coeficiente de variação), foi realizada a análise de variância para verificar a existência de diferenças entre os tipos celulares submetidos aos tratamentos e se houve interação entre as duas variáveis. Como houve interação significativa ($P < 0,05$), foram realizadas análises para cada tipo de célula quando submetida a cada tratamento. As médias foram comparadas pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls), a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1: AVALIAÇÃO DA TRANSFECCÃO COM K2 TRANSFECTION SYSTEM® COMO REAGENTE ALTERNATIVO DE LIPOFECCÃO DAS CÉLULAS 293.

O reagente de transfecção K2 Transfection System® mostrou-se capaz de transfectar as células 293 (Figura 06) utilizadas para a produção do lentivirus, porém tanto a eficiência de transfecção bem como a expressão do transgene medida pela intensidade de fluorescência foi menor do que as apresentadas quando a Lipofectamina 2000® foi utilizada (Tabela 01).

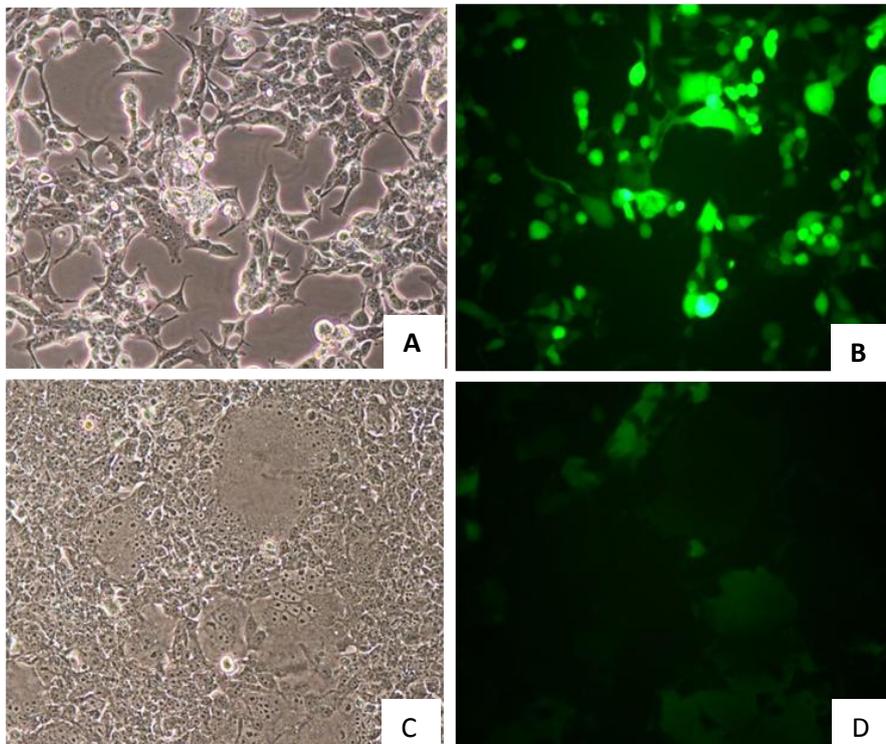


Figura 06: Células 293 transfectadas utilizando a Lipofectamina 2000® (A e B) e o reagente K2 (C e D), observadas sob microscopia ótica de luz e de fluorescência, respectivamente. Aumento 200X.

Tabela 01: Percentual e intensidade de fluorescência da proteína GFP nas células 293 produzidas utilizando a Lipofectamina 2000® (CTRL) e o K2 Transfection System®.

Reagente para a transfecção das células 293	% GFP ⁺ X ± DP	Int. de fluorescência X ± DP
Lipofectamina 2000®	85,85 ± 0,07 ^a	51594,5 ± 290.6 ^a
K2 Transfection System®	17,60 ± 1,41 ^b	14111,5 ± 2789.5 ^b
Controle	0,5 ± 0,05 ^c	506,0 ± 230,6 ^c

Médias seguidas de letra diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

5.2: EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO ENTRE OS TIPOS CELULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE TRANSFEÇÃO.

Tanto a lipofecção como a transdução lentiviral (Figura 07) mostraram-se capazes de produzir células transgênicas a partir dos tipos celulares avaliados. O sistema lentiviral utilizando a Lipofectamina 2000® para a produção do lentivirus (G1) mostrou-se o método mais eficiente (porcentagem de células positivas, GFP⁺) de transfecção independente do tipo celular utilizado, apresentando elevado número de células positivas por amostra (fibroblastos fetais 88,8 % ± 0,98, fibroblastos adultos 91,6 % ± 2,96 e células da granulosa 60,7 ± 14.7) (Tabela 02 e figura 07).

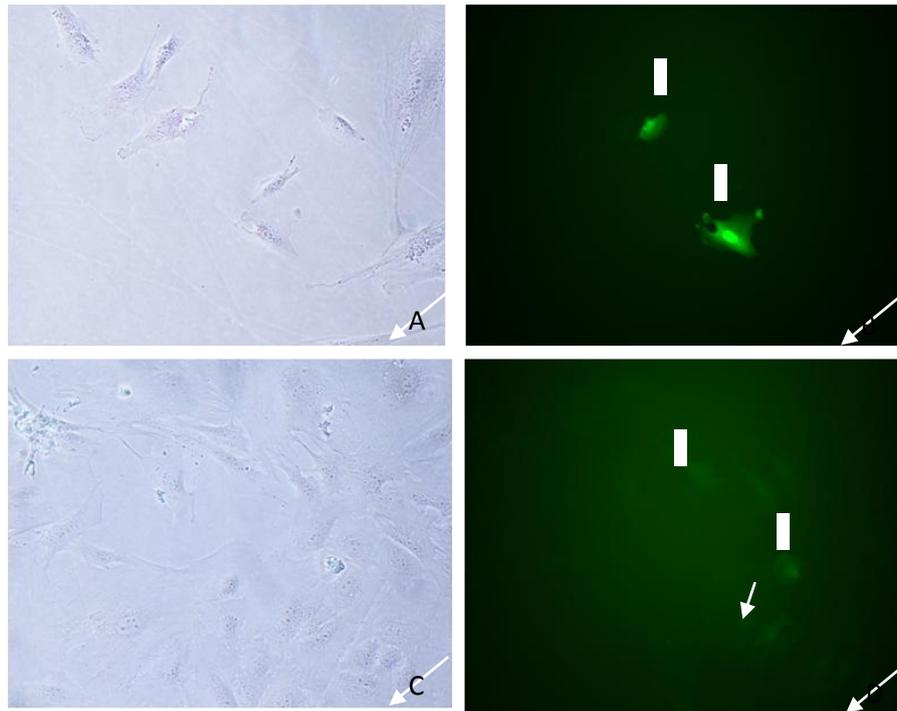


Figura 07: Fibroblastos adultos transgênicos produzidos por lipofecção (A e B) e transdução lentiviral (C e D), utilizando o plasmídeo FUGW, observados sob microscopia ótica de luz e de fluorescência, respectivamente. As setas apontam as células transgênicas expressando a GFP emitindo fluorescência verde quando expostas a luz ultra violeta. Aumento 200X.

Tabela 02: Percentual de células emitindo fluorescência verde (GFP⁺). Fibroblastos fetais (FF), adultos (FA) e células da granulosa (CG) submetidos a 6 metodologias de transfecção analisados por citometria de fluxo.

	FF %GFP ⁺ X ± DP	FA %GFP ⁺ X ± DP	CG %GFP ⁺ X ± DP
1 (LENTI/LIPO+FUGW)	88,8 ± 0,98 ^{A a}	91,6 ± 2,96 ^{A a}	60,7 ± 14,7 ^{A a}
2 (LENTI/k2+FUGW)	3,6 ± 1,13 ^{CD a}	1,9 ± 0,42 ^{CD a}	3,8 ± 1,69 ^{BC a}
3 (LIPO+FUGW)	17,8 ± 2,82 ^{B a}	10,66 ± 0,65 ^{B b}	3,9 ± 1,97 ^{BC c}
4 (LIPO+pEGFP)	4,9 ± 0,14 ^{CD a}	2,4 ± 0,70 ^{CD b}	1,05 ± 0,21 ^{D b}
5 (K2+FUGW)	8,2 ± 3,32 ^{C a}	5,0 ± 0,42 ^{C a}	7,95 ± 0,63 ^{B a}
6 (K2 +pEGFP)	1,4 ± 1,06 ^{D a}	0,8 ± 0 ^{D a}	2,20 ± 0,28 ^{CD a}
CTRL	0,15 ± 0,07 ^{D a}	0,15 ± 0,07 ^{D a}	0,05 ± 0,07 ^{E a}

1- LENTI/LIPO+FUGW: Lentivirus produzido utilizando a Lipofectamina 2000®, plasmídeo FUGW; 2- LENTI/K2+FUGW: Lentivirus produzido utilizando a K2, plasmídeo FUGW; 3- Lipofectamina e o plasmídeo FUGW; 4- Lipofectamina e o plasmídeo pEGFPN₂; 5- K2 e o plasmídeo FUGW 6- K2 e o plasmídeo pEGFPN₂. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúscula na linha pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

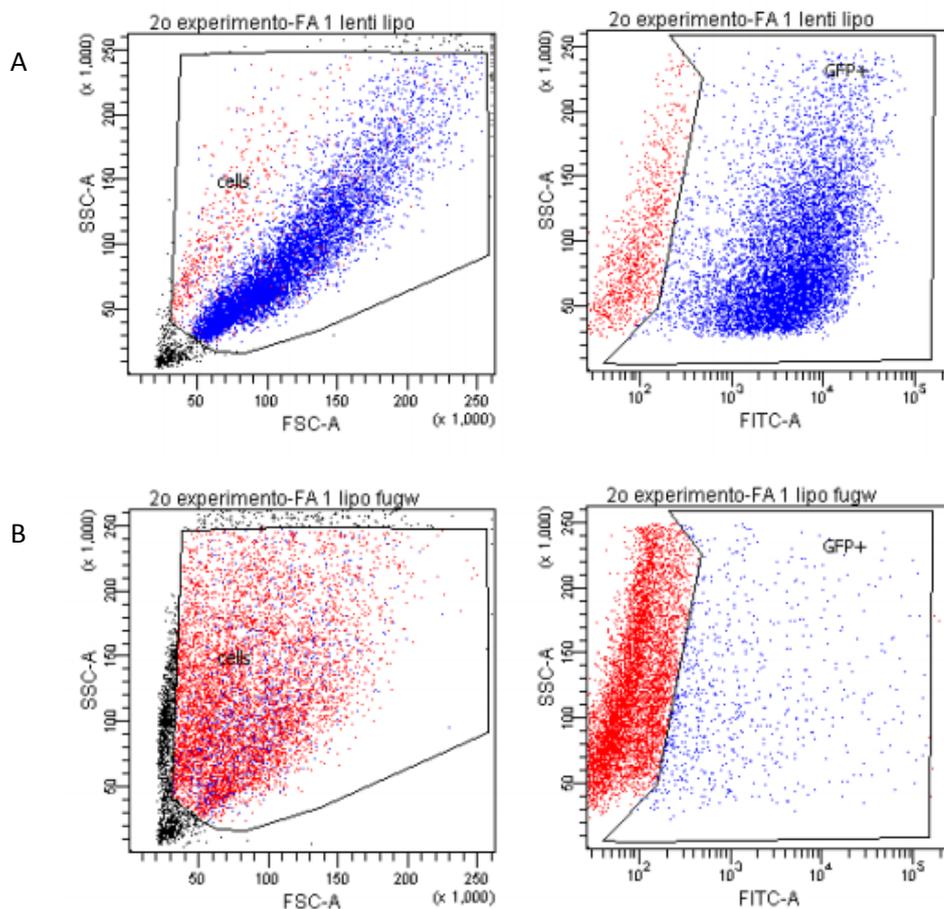


Figura 08: Análise por citometria de fluxo de fibroblastos adultos quando submetidos a transdução lentiviral (A) ou a lipofecção utilizando a Lipofectamina 2000 (B). Em ambos os tratamentos foi utilizado o plasmídeo FUGW.

Quando o K2 foi utilizado para a transfecção das células 293 e consequente produção do lentivirus (G2) para a posterior infecção celular, os resultados foram significativamente inferiores aos obtidos com o uso da Lipofectamina. Apenas nas células do granulosa o uso do K2 produziu resultados de transfecção significativamente superiores do controle.

O uso da Lipofectamina 2000® e da construção FUGW (G3) apresentou resultados de transfecção significativamente inferiores apenas aos do tratamento 1 (lentivirus/Lipofectamina) quando se utilizou fibroblastos fetais e adultos para a

transfecção(Figura 08). Nas culturas de células da granulosa resultou em baixos índices de transfecção ($3,9 \pm 1,97$).

O uso do K2 em combinação com o plasmídeo FUGW mostrou-se capaz de transfectar as células em cultura diferindo significativamente do grupo controle, porém a porcentagem de transfecção foi menor que 10% da alcançada com o tratamento 1.

Quando o plasmídeo pEGFPN2 foi utilizado, somente nas células da granulosa número de células GFP+ diferiu significativamente do grupo controle, independente do reagente de transfecção utilizado. Nos demais tipos celulares não houve porcentagem satisfatória de expressão quando esta construção foi utilizada não diferindo significativamente do grupo controle.

5.3: NÍVEL DE EXPRESSÃO DA GFP NOS TIPOS CELULARES SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE TRANSFECCÃO.

O nível de expressão da proteína GFP não diferiu significativamente ($P \geq 0,05$) quando foi utilizada a transdução lentiviral (G1) ou a lipofecção em conjunto com o plasmídeo FUGW (G3) (tabela 03), independente do tipo celular analisado.

Nas culturas de fibroblastos adultos, tais metodologias (T1 e T3) de transfecção foram as únicas capazes de produzir expressão do transgene significativamente diferente do grupo controle ($P \geq 0,05$). Somente nos fibroblastos fetais e nas células da granulosa houve expressão do transgene quando o reagente de transfecção K2 foi utilizado para a internalização do plasmídeo FUGW, diferindo significativamente do grupo controle.

Quando a construção pEGFPN₂ foi utilizada, houve expressão satisfatória da proteína GFP apenas nas células da granulosa tratadas com a Lipofectamina.

Nas células da granulosa o uso do K2 e da construção FUGW produziu menos intensidade de fluorescência (1091 ± 234.75), porém atingiu índices semelhantes aos alcançados com a utilização da lipofectamina associada ao plasmídeo FUGW (3496 ± 2638.92) e que diferiram significativamente do controle (214 ± 0).

Quando o sistema lentiviral (T1) e a Lipofectamina 2000® em conjunto com o plasmídeo FUGW (T3) foram utilizados, os fibroblastos adultos apresentaram melhores índices de expressão do transgene, seguidos pelas células da granulosa e fibroblastos fetais, independente do reagente de transfecção utilizado.

Tabela 03: Intensidade de fluorescência em fibroblastos fetais, adultos e células *do cumulus*, submetidos a diferentes metodologias de transfecção analisadas por citometria de fluxo.

	Fibroblastos Fetais Média ± DP	Fibroblastos Adultos Média ± DP	Células do <i>cumulus</i> Média ± DP
T1 (LENTI/LIPO+FUGW)	4273 ± 118.79 ^{Ab}	7957.5 ± 1120 ^{Aa}	6020.5 ± 310,42 ^{Aab}
T2 (LENTIV/k2+FUGW)	1053 ± 14.14 ^{BC b}	1137.5 ± 331.63 ^{Ba}	1470 ± 79,20 ^{Bab}
T3 (LIPO+FUGW)	4542 ± 497.09 ^{Ab}	9367.5 ± 3490.9 ^{Aa}	3496 ± 2638.92 ^{Aab}
T4 (LIPO+pEGFP)	755 ± 206.47 ^{BC a}	760 ± 330.92 ^{Ba}	1418 ± 36.06 ^{Ba}
T5 (K2+FUGW)	1547 ± 601.04 ^{B a}	1459 ± 186.67 ^{Ba}	1091 ± 234.75 ^{Ba}
T6 (K2 +pEGFP)	750 ± 282.13 ^{BCa}	365 ± 69.29 ^{Ba}	301.5 ± 10.60 ^{Ca}
Controle	249 ± 6.36 ^{Ca}	588 ± 213.54 ^{Ba}	214 ± 0 ^{Ca}

1- LENTI/LIPO+FUGW: Lentivirus produzido utilizando a Lipofectamina 2000®, plasmídeo FUGW; 2- LENTI/K2+FUGW: Lentivirus produzido utilizando a K2, plasmídeo FUGW; 3- Lipofectamina e o plasmídeo FUGW; 4- Lipofectamina e o plasmídeo pEGFP₂; 5- K2 e o plasmídeo FUGW 6- K2 e o plasmídeo pEGFP₂. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúsculas na coluna e minúscula na linha pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

5.4: PRODUÇÃO DE CÉLULAS TRANSGÊNICAS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS QUALITATIVOS

Como citado anteriormente ambos os métodos de transfecção, a lipofecção e transdução lentiviral, foram eficazes para a produção de células expressando o transgene independente do tipo celular utilizado. Com relação ao aspecto morfológico das células pós-transfecção, os grupos submetidos a transdução lentiviral (T1 e T2) apresentavam melhor aspecto celular (menor número de células mortas/campo, menor número de vacúolos citoplasmáticos, sinais de morte celular, etc) (Figura 09).

Os grupos de cultivo submetidos a lipofecção utilizando o reagente K2 apresentavam qualidade morfológica intermediária e as células submetidas aos tratamentos com a Lipofectamina 2000® (Fig. 04, B) demonstravam o pior aspecto morfológico, apresentando elevado número de células mortas e presença de vacúolos citoplasmáticos.

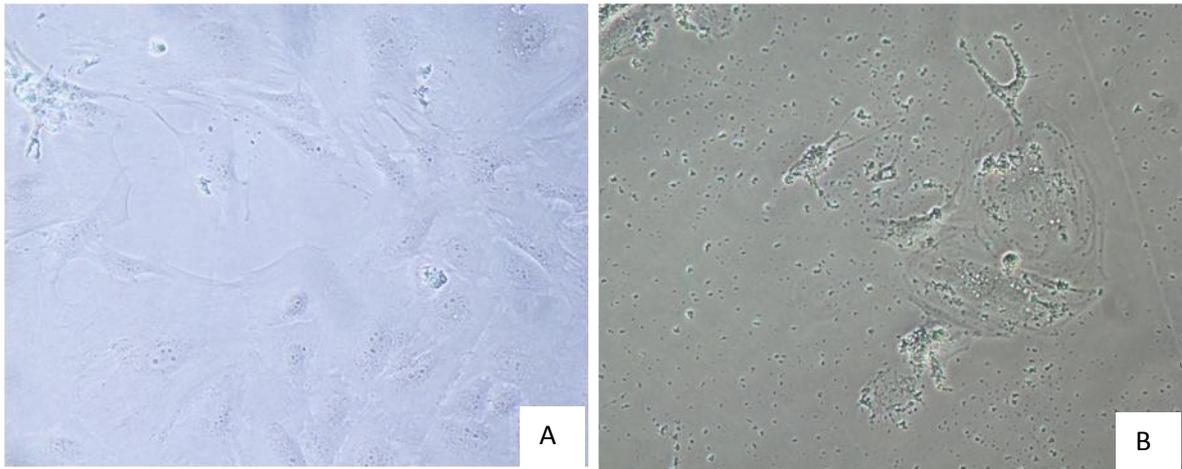


Figura 09: Célula da granulosa transgênica pós transfecção utilizando transdução lentiviral (A) Lipofectamina 2000® (B), observados sob microscopia ótica de luz. Observar a presença de debris celulares, menos número de células/campo e a presença de vacúolos citoplasmáticos. Aumento 200X.

Dos tipos celulares analisados, as células da granulosa foram as que apresentaram maior número de vacúolos citoplasmáticos (Fig. 108) e sinais de morte celular pós-transfecção. Os fibroblastos fetais e adultos não apresentavam tais estruturas não diferindo em aspectos morfológicos do controle.

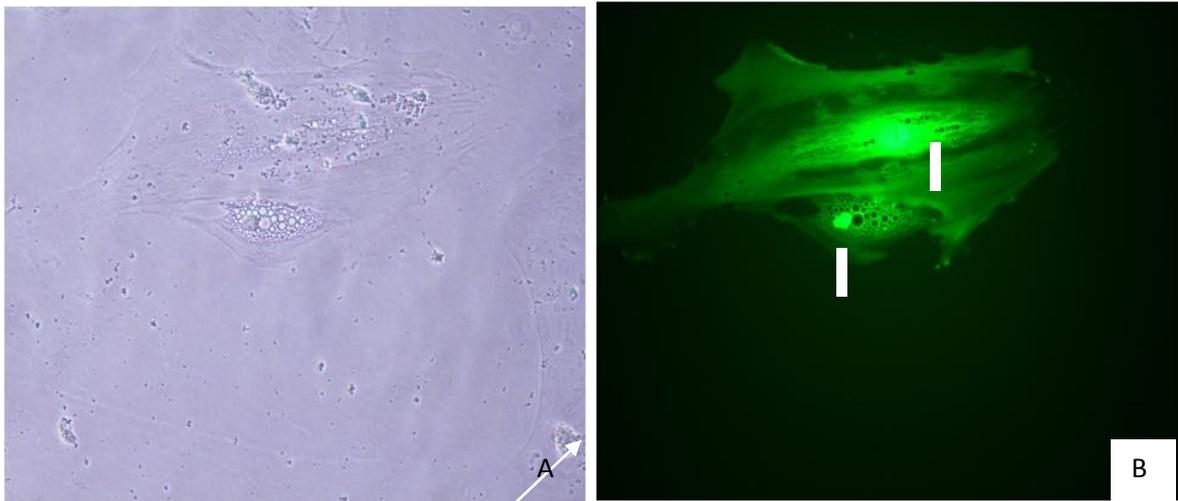


Figura 10: Célula da granulosa transgênica pós transfecção utilizando Lipofectamina 2000®, observados sob microscopia ótica de luz e de fluorescência, respectivamente. Observar a presença de debris celulares e dos vacúolos citoplasmáticos (seta). Aumento 600X.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que, tanto a transdução lentiviral, bem como a lipofecção podem ser utilizadas para a produção de fibroblastos fetais, adultos e células da granulosa transgênicas. A transdução lentiviral utilizando a Lipofectamina para a transfecção das células 293, foi o método mais eficiente de transferência gênica, independente do tipo celular utilizado, resultando em um elevado número de células GFP⁺.

Dois reagentes de lipofecção das células produtoras de lentivirus (293FT *cells*) foram comparados neste trabalho: a Lipofectamina 2000® e o K2 Transfection System®. Apesar do K2 Transfection System® ter sido capaz de transfectar as células 293, a eficiência de transfecção foi inferior à obtida quando a Lipofectamina 2000® foi utilizada. Por tratar-se de um reagente novo e ainda pouco testado, é possível que algumas adequações nos protocolos devam ser feitas a fim de aumentar a sua eficiência de transfecção.

O uso da lipofectamina para a transfecção das células 293 e consequente produção das partículas virais utilizadas no G1 (Lenti/lipo+FUGW) resultou em níveis de transfecção bastante superiores aos dos demais tratamentos. O uso de vetores retrovirais é uma poderosa ferramenta de modificação genética de células para serem utilizadas na produção de animais transgênicos, principalmente devido ao fato dos retrovírus utilizarem seus próprios mecanismos biológicos de infecção para a transdução das células, promovendo uma transdução estável e duradora da célula alvo. Neste estudo foram utilizados para as transduções vetores lentivirais, que apresentam como vantagem particular o fato de infectarem células que estejam ou não em divisão, devido a sua capacidade de transportar seu complexo pré-integração de maneira ativa para dentro do núcleo garantindo assim a integração (PFEIFER, 2003; PARK, 2007). É provável que a estes fatores possa ser atribuída a superioridade na produção de células transgênicas quando o sistema lentiviral foi utilizado.

Em contrapartida, quando uma sequencia exógena de DNA é inserida em uma célula mamífera por lipofecção, o DNA é liberado no citoplasma e depende da maquinaria celular para chegar ao núcleo. A integração ao DNA cromossomal ocorre de maneira espontânea, porém trata-se de um processo raro, o que torna a expressão, quando presente, imprevisível (BRESSAN et al., 2008). De acordo com o que tem sido demonstrada por alguns autores, esta pode ser uma das principais causas da baixa eficiência na produção de animais transgênicos. Tal fato também pode ter ocasionado os índices inferiores de transfecção obtidos quando a Lipofectamina e o K2 foram utilizados neste trabalho.

A Lipofecmina 2000 quando utilizada em conjunto com o FUGW mostrou-se como a segunda metodologia mais eficiente de transfecção das células analisadas. Tendo em vista o fato de que a manipulação de retrovírus em laboratório guarda

certas restrições relacionadas a biossegurança, a lipofecção constituiria uma alternativa para pesquisadores que ainda não possuem tal estrutura em seus laboratórios. Além disso, a lipofecção é um método simples de transfecção e que tem sido muito utilizado. Porém ajustes nos protocolos são necessários para cada tipo celular, construção gênica e condições laboratoriais, visando um aprimoramento nos índices de transfecção e redução das mortes celulares pós transfecção, que neste estudo foram expressivas quando este método foi utilizado.

Quando o K2 foi utilizado juntamente com plasmídeo FUGW na transfecção dos fibroblastos fetais e adultos e das células do *cumulus*, mostrou-se capaz de transfectar as células, entretanto produziu porcentagem de transfecção e níveis de expressão inferiores aos alcançados com o uso da Lipofectamina 2000®. Devido ao fato do K2 ter sido desenvolvido para a transfecção de células humanas, é possível que os resultados obtidos tenham sido decorrentes de particularidades das células bovinas utilizadas. Não há registros de acordo com o nosso conhecimento de experimentos que tenha comparado a eficiência entre tais reagentes de lipofecção nas células 293 e nos tipos celulares analisados neste trabalho.

Neste trabalho a utilização do vetor FUGW independente do método de transfecção e do tipo celular ocasionou os melhores índices de transfecção e de expressão do transgene. Este vetor contém além da região codificante de expressão do gene repórter GFP, uma região regulatória pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, WRE) introduzida para aumentar os níveis de transcrição da proteína. Para aumentar os títulos virais o *flap* do vírus da imunodeficiência humana-1 foi inserido entre os LTR's que também são partes integrantes do plasmídeo. Nesta construção o promotor *human ubiquitin-C* é utilizado. Segundo LOIS *et al.* (2002), após muitos experimentos tal promotor promoveu melhor expressão dentre os tipos celulares e por isso foi selecionado para a construção do vetor. Desta forma, a melhor expressão da proteína GFP pode ter sido resultante da utilização desta construção.

Quando a construção pEGFPN2 foi utilizada em conjunto com a Lipofectamina, somente as células da granulosa apresentaram expressão do transgene. Segundo as instruções dos fabricantes dos métodos de lipofecção, para atingir níveis satisfatórios

de transfecção é necessário que o DNA utilizado seja purificado e livre de endotoxinas, substâncias que podem reduzir drasticamente os níveis de transfecção. Neste trabalho somente o plasmídeo FUGW foi preparado por tal metodologia. Além disso, a construção pEGFPN₂ utiliza o cytomegalovirus (CMV *promoter*) como promotor, que segundo alguns autores tem apresentado menores índices de transcrição do transgene (LOIS et al., 2002).

Neste trabalho foi utilizada a citometria de fluxo para determinar o número de células GFP⁺ e o nível de expressão relacionado a intensidade de fluorescência das células transgênicas. A proteína verde fluorescente (GFP) tem sido difundida como uma importante ferramenta espacial e temporal de análise *in vivo* dos padrões de expressão de um gene. Segundo SOBOLESKI *et al.* (2005), a GFP é um gene *reporter* de elevada confiabilidade para determinação da expressão gênica quando as células são submetidas a citometria de fluxo, principalmente devido a dois fatores: a fluorescência da proteína verde aumenta em proporção direta com o número de cópias entregues a célula e a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional a quantidade de RNAm contida na célula. As análises por citometria de fluxo deste trabalho foram realizadas 48 horas pós transfecção, por isso é possível que mais experimentos sejam necessários para determinar se os dados obtidos são resultantes de transfecções estáveis ou transientes.

Os fibroblastos fetais e adultos têm sido o tipo celular mais utilizado na transferência nuclear. Em 2001, ARAT *et al.*, da granulosa, para a produção de bovinos transgênicos por TN. GUOCHUM *et al.*, 2004 comparam, dentre outros fatores, a eficiência e o nível de expressão em fibroblastos fetais, células da granulosa e em células fetais epiteliais ovarianas e do oviduto para serem usados como doadores de núcleo na TN. Com relação a eficiência de transfecção (colônias GFP⁺/10⁵), os fibroblastos fetais mostraram-se mais eficientes, seguidos pelas células da granulosa e finalmente pelas células epiteliais. Com relação aos níveis de expressão do transgene as células epiteliais apresentavam maior nível de fluorescência, seguidos pelos fibroblastos fetais e pelas células da granulosa. Porém tais autores utilizaram a eletroporação como método de transfecção das células e para análise de eficiência e de expressão a observação visual, um método subjetivo de avaliação.

Em nosso trabalho, os grupos tratados com a Lipofectamina, a eficiência de transfecção diferiu entre os tipos celulares, sendo maior nos fibroblastos fetais, seguidos dos fibroblastos adultos e finalmente pelas células do *cumulus*. Com relação a intensidade de fluorescência relacionada ao nível de expressão do transgene não houve diferença entre os tipos celulares quando este tratamento foi utilizado. Quando a transdução lentiviral foi utilizada somente a intensidade de fluorescência variou de acordo com os tipos celulares. Os fibroblastos adultos e as células da granulosa apresentaram maior intensidade de fluorescência.

É possível que não só o tipo celular possa influenciar os níveis de expressão do transgene, mas também fatores como o tecido de origem, o número de passagens celulares e o momento do ciclo celular. Além disso, a expressão gênica é regulada por fatores epigenéticos, tais como a metilação do DNA e a acetilação das histonas. Em especial, a acetilação das moléculas de histona na cromatina está associada com um aumento na expressão de determinados genes (ENRIGHT *et al.*, 2003)

Tais resultados confirmam a influência do tipo celular e do método de transfecção na eficiência da transferência e na intensidade de fluorescência relacionada a expressão gênica, porém as causas dessas diferenças não estão totalmente elucidadas.

6. CONCLUSÕES

6.1: A eficiência de transferência gênica difere entre os tipos celulares segundo o método de transfecção utilizado;

6.2: O método de transdução lentiviral resultou em melhores taxas de expressão gênica independente do tipo celular;

6.3: Os melhores resultados de expressão gênica foram obtidos com células adultas, o que pode representar uma vantagem para a produção de animais transgênicos por transferência nuclear.

6.4: Para laboratórios que não possuem estrutura para a manipulação viral, a lipofecção pelo uso da Lipofectamina 2000® pode apresentar-se como uma alternativa para a produção de células transgênicas.