

ANDRESSA PEREIRA DE SOUZA

**TRANSFERÊNCIA GÊNICA DE FIBROBLASTOS, OÓCITOS E EMBRIÕES
SUÍNOS MEDIADA POR POLIETILENOIMINA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André da Veiga Lima
Rosa

Coorientadora: Dra. Mariana Groke Marques

**Lages, SC
2019**

Souza, Andressa Pereira de
Transferência gênica de fibroblastos, oócitos e embriões
suínos mediada por polietilenoimina / Andressa Pereira de
Souza. – 2019.
87 p.

Orientador: Carlos André Da Veiga Lima Rosa
Coorientador: Mariana Groke Marques
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2019.

1. Polímero Catiônico. 2. Vetores não virais. 3. Entrega de
genes. I. Rosa, Carlos André Da Veiga Lima . II. Groke
Marques, Mariana . III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

A minha família dedico ...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que tem me proporcionado ao longo da vida. Agradeço em especial a minha família por ter sempre acreditado em mim e por proporcionar condições para a realização dos meus sonhos.

Ao meu companheiro Albert, por todo amor e apoio incondicional nesta caminhada.

A meu orientador prof. Carlos André, pela confiança e oportunidade de obtenção deste título, aos professores do CAV que com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

A minha amiga e coorientadora Mariana pela amizade, confiança e todos os ensinamentos. No período que convivemos eu cresci não só como profissional, mas também como mulher, aquela que luta pelo que acredita e não se deixa corromper, você é meu exemplo, Muito Obrigada! Ao Dahmer, pela amizade e auxílio na realização dos experimentos, você é um exemplo de dedicação e profissionalismo. Agradeço também ao José e a Ana Paula, sua amizade e apoio foram muito importantes para mim.

A todas pessoas que passaram pelo laboratório de reprodução, com quais tive a oportunidade de aprender e que me ajudaram chegar até aqui, em especial a Dani, Ger, Bruna S, Bruma M, Amanda, Manu, Lana, Silvana, Jéssica, Karol e Shai, obrigada pela amizade!

Agradeço também todos os profissionais que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho em especial ao Noé, Sandra, Adriana, Alexandre, equipe do NAP e todos que contribuíram para o desenvolvimento deste. A Embrapa Suínos e Aves e aos frigoríficos Ecofrigo e Frigolaste por possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação Ciência Animal/ UDESC, pela oportunidade de realizar o doutorado. Ao Programa UNIEDU pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que fizeram do meu doutorado, um período de crescimento pessoal, técnico e profissional, muito obrigada!

RESUMO

SOUZA, A. P. **Transferência gênica de fibroblastos, oócitos e embriões suínos mediada por polietilenoimina**. 2019. 87p. Tese (Doutorado em Ciência Animal. Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2019.

Diferentes metodologias são utilizadas para produzir suínos transgênicos, entre elas estão microinjeção pronuclear, transferência gênica mediada por espermatozoide, microinjeção de vetores retrovirais em oócitos, transferência nuclear de células somáticas previamente modificadas. Todos esses métodos foram capazes de produzir com sucesso suínos transgênicos. Porém, ainda apresentam limitações, como a baixa integração do transgene e baixo percentual de animais produzidos, ainda, algumas são caras e laboriosas. Assim, torna-se relevante o desenvolvimento de métodos e padronizações que aumentem a eficiência e melhorem a relação custo-benefício da produção de suínos geneticamente modificados. A Polietilenoimina (PEI) é um polímero catiônico, que condensa o DNA em partículas carregadas positivamente, formando complexos que se ligam aos resíduos de superfície aniônicos e são levados para dentro da célula por endocitose. Tem-se descrito o uso da PEI como um bom agente transfectante numa ampla gama de tipos celulares, apesar disso, até o momento não há um protocolo desenvolvido para este polímero visando a transfecção de células na espécie suína. Diante disto, o objetivo do presente trabalho desenvolver protocolos de transfecção celular eficiente para fibroblastos fetais, oócitos e embriões suínos. Para isso, o presente trabalho foi realizado em duas etapas. A etapa I consistiu no desenvolvimento de um protocolo para de transfecção gênica para fibroblastos fetais suínos (FFS). Para isso foram conduzidos 3 experimentos. No experimento 1 foi avaliada a capacidade da PEI de ser internalizada em diferentes concentrações (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80µg/mL) por incubação em diferentes períodos (0,5, 1 e 2 horas). O experimento 2 foi realizado para determinar a melhor razão polímero/eDNA, sendo o grau de complexação avaliado por eletroforese em gel de agarose. No experimento 3, a transfecção foi realizada baseada nos resultados dos experimentos anteriores. Para a transfecção, foram utilizadas as concentrações 10 e 40µg/mL, a razão N/P igual a 2, por um período de incubação de 0,5h. Não foi verificada diferença entre as concentrações de PEI utilizadas na porcentagem de células positivas para GFP, no entanto, a concentração de 40µg/mL causou maiores danos as células transfectadas. Além disso, a GFP foi expressa por um período de 3 dias, o que sugere que o plasmídeo atingiu o núcleo dos fibroblastos, tendo o gene sido expresso de forma não transiente. A etapa II, consistiu no desenvolvimento de um protocolo para de transfecção gênica para oócitos e embriões suínos. Nesta etapa foram conduzidos 2 experimentos. No experimento 1 foi avaliada a capacidade da PEI de ser internalizada em diferentes concentrações (10; 20; 40 e 80µg/mL). No experimento 2, baseado nos resultados do experimento 1, as transfecções foram realizadas utilizando as concentrações 20 e 80µg/mL, a razão de PEI/ eDNA igual a 2, por 0,5h de incubação. Nesta etapa foi demonstrado que a PEI, diferente de outros agentes transfectantes, tem a capacidade de passar a zona pelúcida, sendo o protocolo desenvolvido foi capaz de produzir blastocistos transgênicos para GFP, tanto de oócitos e embriões transfectados. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que através da transfecção gênica mediada pela polietilenoimina

foi possível gerar fibroblastos e blastocistos suínos transgênicos para proteína verde fluorescente de forma eficiente.

Palavras-chave: Polímero catiônico. Vetores não virais. Entrega de genes.

ABSTRACT

SOUZA, A. P. **Polyethyleneimine-mediated gene transfer in swine fibroblast, oocyte and embryos**. 2019. 87p. Doctoral Thesis in Animal Science. Area of concentration: Animal Production – Santa Catarina State University. Animal Science Postgraduate Program, Lages, 2018.

Different methodologies are used to produce transgenic pigs, among them are pronuclear microinjection, sperm-mediated gene transfer, microinjection of retroviral vectors into oocytes, and nuclear transfer of previously modified somatic cells. These methods are able to successfully produce transgenic pigs. However, limitations such as low transgene integration and low percentage of animals produced, furthermore some are expensive and laborious. The development of methods and standards increases the efficiency and improve the cost-benefit ratio of genetically modified pig production becomes relevant. Polyethyleneimine (PEI) is a cationic polymer which condenses the DNA into positively charged particles forming complexes that bind to the anionic surface residues and are carried into the cell by endocytosis. The use of PEI as a transfectant agent in a wide range of cell types has been described, however, so far has not been yet a protocol developed for this polymer to transfect cells into the swine species. In view of this, the objective of the present work was to develop efficient cellular transfection protocols for fetal fibroblasts, oocytes and swine embryos. The present work was carried out in two stages. Stage I consisted of the development of a protocol for gene transfection for swine fetal fibroblasts (FFS). Therefore, 3 experiments were conducted. In the experiment 1, the capacity of the PEI to be internalized at different concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 µg / mL) by incubation at different periods (0.5, 1 and 2 hours). Experiment 2 was performed to determine the best polymer / eDNA ratio, and the degree of complexation was evaluated by agarose gel electrophoresis. In experiment 3, transfection was performed based on the results of the above experiments. For transfection, the concentrations 10 and 40 µg / mL were used, the N / P ratio was 2, for an incubation period of 30 minutes. No difference was found between the concentrations of PEI used in the percentage of GFP positive cells, however, the concentration of 40 µg / ml caused greater damage to the transfected cells. In addition that, GFP was expressed for a period of 3 days, suggesting that the plasmid reached the fibroblast nucleus, and the gene was expressed non-transiently. Stage II consisted of the development of a protocol for gene transfection for oocytes and swine embryos. In this stage 2 experiments were conducted. In the experiment 1, the capacity of the PEI to be internalized in different concentrations (10; 20; 40 and 80 µg/mL) was evaluated. In experiment 2, based on the results of experiment 1, transfections were performed using concentrations of 20 and 80 µg / mL, the PEI / eDNA ratio was 2, for 0,5 hours of incubation. In this step it was demonstrated that PEI, unlike other transfecting agents, has the ability to pass the zona pellucid, and the protocol developed was able to produce transgenic blastocysts for GFP, both oocytes and transfected embryos. The results presented in this work show that through polyethyleneimine-mediated gene transfection it was possible to generate transgenic fibroblasts and swine blastocysts to efficiently express fluorescent green protein.

Keywords: Cationic polymer. Non-viral vectors. Gene delivery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1 Médias das porcentagens de células que internalizaram a PEI/FITC quando submetidas a diferentes tempos de incubação (A) e diferentes concentrações de PEI-FITC (B). Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).....46
- Figura 2 Fibroblastos fetais suínos incubados com PEI-FITC por 0,5h. Fibroblastos incubados com 10 μ g/mL de PEI-FITC em luz branca (A) e luz ultravioleta (A'). Fibroblastos incubados com 40 μ g/mL de PEI-FITC em branca (B) e luz ultravioleta (B').....46
- Figura 3 Eletroforese em gel de agarose de diferentes razões PEI-eDNA.....47
- Figura 4 Médias das porcentagens de fibroblastos fetais suínos que expressaram proteína verde fluorescente após incubação com os poliplexos. A: Expressão de GFP de acordo com a concentração de PEI no poliplexo. B: Expressão de GFP ao longo do tempo. Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).....48
- Figura 5 Médias das porcentagens de fibroblastos fetais suínos com lesão de membrana citoplasmática transfectados com diferentes concentrações de PEI ao longo do tempo. Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).....50
- Figura 6 Figura 6 - Avaliação da expressão de GFP (avaliados no canal FL-1, linha superior) e integridade de membrana plasmática (canal FL-2, linha inferior) dos FFS após 24 horas da transfecção, realizada através de citometria de fluxo. A' e B': Grupo controle (sem incubação com poliplexos). A'' e B'': Fibroblastos fetais suínos transfectados com o poliplexos 1. A''' e B''': Fibroblastos fetais suínos transfectados com o poliplexos 2.....50

Capítulo 2

- Figura 1 Coleta de embriões suínos. Dissecção do oviduto (Figuras 1A e 1B). Localização da entrada do infundíbulo (Figura 1C). Lavagem do oviduto (Figura 1D). Retirada do oviduto por incisão na junção útero-tubárica (Figura 1E). Inserção da sonda plástica para a realização de nova lavagem (Figura 1F). Suspensão do corno uterino pela região cranial (Figura 1G). Deslocamento do líquido por massagem em direção caudal e a extremidade cranial obliterada com auxílio de pinça hemostática (Figura 1H). Coleta do líquido que continha os embriões por gravidade pela suspensão da região cranial do corno uterino (Figura 1I e 1J).....66
- Figura 2 Média da concentração de PEI-FITC (média de pixels) em oócitos suínos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC, analisadas utilizando o software de análise de imagens ImageJ 1.40g®. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).....73
- Figura 3 Oócitos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC avaliados em microscópio de fluorescência. A: Concentração 10ug/mL; B: Concentração 20ug/mL; C: Concentração 40 ug/mL e D: Concentração 80ug/mL.....74
- Figura 4 Média da concentração de PEI-FITC (média de pixels) em zigotos suínos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC, analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J 1.40g®. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).....75
- Figura 5 Zigotos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC avaliados em microscópio de fluorescência. **A:** Concentração 10ug/mL; **B:** Concentração 20ug/mL; **C:** Concentração 40 ug/mL e **D:** Concentração 80 ug/mL.....76
- Figura 6 Média das porcentagens de clivagem, blastocistos e blastocisto GFP positivos dos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.....77

Figura 7	Avaliação da expressão gênica do blastocisto produzido a partir de oócitos transfectados com pmhyGENIE-5 mediado por PEI na concentração de 20 µg/mL, razão n/p=2 por 0,5h (PEI-O20). A: Blastocisto em eclosão marcado com Hoescht em luz ultravioleta. B: Blastocisto em eclosão expressando proteína verde fluorescente em luz ultravioleta.....78
Figura 8	Média das porcentagens, blastocistos e blastocisto GFP positivos nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos ± EP.....79
Figura 9	Avaliação da expressão gênica do blastocisto produzido a partir de embriões maturados in vivo transfectados com pmhyGENIE-5 mediado por PEI na concentração de 20 µg/mL, razão n/p=2 por 0,5h (PEI20). A: Blastocisto expandido marcado com Hoescht em luz ultravioleta. B: Blastocisto expandido expressando proteína verde fluorescente em luz ultravioleta..... 79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 MÉTODOS DE TRANSFECCÃO GÊNICA	23
2.1.1 Métodos Virais	23
2.1.2 Métodos físicos	24
2.1.3 Métodos químicos	25
3 REFERÊNCIAS	31
4 CAPÍTULO 1: TRANSFECCÃO GÊNICA DE FIBROBLASTOS FETAIS SUÍNOS MEDIADA POR POLIETILENOIMINA	37
4.1 INTRODUÇÃO.....	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.2.1 Reagentes e Químicos	39
4.2.2 Preparação da PEI	39
4.2.3 Conjugação PEI-FITC.....	40
4.2.4 Cultivo celular	40
4.2.5 Experimento 1: Avaliação da internalização da PEI-FITC.....	41
4.2.6 Experimento 2: Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética	41
4.2.7 Experimento 3: Transfecção de fibroblastos fetais suínos	43
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4.4 RESULTADOS.....	45
4.4.1 Experimento 1: Avaliação da internalização da PEI-FITC.....	45
4.4.2 Experimento 2: Eletroforese em gel de agarose	47
4.4.3 Experimento 3: Transfecção de fibroblastos fetais suínos	48
4.5 DISCUSSÃO	51
4.6 REFERÊNCIAS	56
5 CAPÍTULO 2: TRANSFECCÃO GÊNICA EM OÓCITOS E EMBRIÕES SUÍNOS MEDIADA POR POLIETILENOIMINA	61
5.1 INTRODUÇÃO.....	62
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.2.1 Colheita dos oócitos para maturação <i>in vitro</i>	63
5.2.2 Maturação <i>in vitro</i>	64
5.2.3 Fecundação <i>in vitro</i>	64

5.2.4 Cultivo <i>in vitro</i>	65
5.2.5 Colheita dos embriões produzidos <i>in vivo</i>	65
5.2.6 Preparação da PEI	66
5.2.7 Conjugação PEI-FITC	67
5.2.8 Experimento 1: Avaliação da internalização de PEI-FITC	67
5.2.9 Experimento 2: Transfecção de Oócitos e Embriões suínos	69
5.3 ANÁLISE ESTÁTISTICA	72
5.4 RESULTADOS	72
5.4.1 Experimento 1: Avaliação da internalização da PEI-FITC	72
5.4.2 Transfecção de Oócitos e Embriões suínos	76
5.4.3 Desenvolvimento Embrionário e Expressão de GFP	76
5.5 DISCUSSÃO	80
5.6 REFERÊNCIAS	83
6 CONCLUSÃO	87

1 INTRODUÇÃO

Animais geneticamente modificados (AGM) são organismos que por ação do homem tenham sequências de DNA exógeno (eDNA) de outra espécie inseridas no seu genoma, ou que seu patrimônio genético tenha sofrido qualquer alteração engendrada e executada pelo intelecto humano (RUMPF; MELO, 2005). Suínos transgênicos ganharam grande importância nos últimos anos. Além do interesse zootécnico pela espécie, esta destaca-se na pesquisa biomédica, pelo fato de haver grande similaridade com o ser humano do tamanho, fisiologia e metabolismo dos órgãos (VAJTA, 2007), bem como na sequência de genes (BENDIXEN et al., 2010). Modificações direcionadas no seu genoma possibilitam que estes animais produzam tecidos ou órgãos para xenotransplante em humanos, proteínas de interesse médico e ainda sejam modelos animais para estudo de doenças humanas (WHITELAW et al., 1999). Além disso, suínos crescem rápido, são altamente prolíferos, e o custo de manutenção é relativamente baixo, características que favorecem a produção de AGM (RUMPF; MELO, 2005).

Diferentes metodologias foram utilizadas para produzir suínos transgênicos, entre elas estão a microinjeção pronuclear (HAMMER et al., 1985), a transferência gênica mediada por espermatozoide (LAVITRANO, et al., 2003), os vetores retrovirais em oócitos (CABOT, 2001), a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) previamente modificadas (PARK et al. 2001) entre outros. Todos esses métodos foram capazes de produzir com sucesso suínos transgênicos, porém ainda apresentam limitações, como a baixa integração do transgene e baixo percentual de animais produzidos, ainda, algumas são caras e laboriosas. Assim, torna-se relevante o desenvolvimento de métodos e padronizações que aumentem a eficiência e melhorem a relação custo-benefício da produção de suínos geneticamente modificados.

Tem-se descrito o uso do polissomo polietilenoimina (PEI) como um bom agente transfectante numa ampla gama de tipos celulares (YAMANO; DAI; MOURS, 2010) e para terapia gênica (SHARMA et al., 2011). A PEI é um polímero catiônico, que condensa o eDNA em partículas carregadas positivamente, formando complexos que se ligam à superfície aniônica e são levados para dentro da célula por endocitose (GAO; KIM; LIU, 2007). Além de apresentar toxicidade limitada e boa eficácia *in vitro* (MAURISSE et al., 2010), estes polímeros

apresentam melhor relação custo-benefício quando comparado a outros agentes (FUKUMOTO et al., 2010). Ainda, acredita-se que o poliplexo atue diminuindo a tendência de fusão endossomal e favorecendo a entrada do eDNA no núcleo (KUNATH et al., 2003). Os complexos PEI/eDNA podem ser adicionados diretamente ao meio de cultura contendo as células, sem a necessidade de dispositivos especializados ou equipamentos caros. Desta forma, podem oferecer uma opção mais acessível e segura para transfecção celular. No entanto, até o momento, apesar de sua promissora utilização, não há um protocolo padronizado para este polímero visando a transfecção de células na espécie suína.

Devido ao seu rápido crescimento e potencial proliferativo, os fibroblastos fetais têm sido o principal tipo celular usado na TNCS associada a transgênese. Fibroblastos fetais usualmente são mais fáceis de serem reprogramadas do que células adultas (HEYMAN et al., 2002). Lee et al. (2003) demonstraram que a utilização de fibroblastos fetais na TNCS de suínos, resulta em melhor desenvolvimento embrionário quando comparado a qualquer célula doadora adulta. Apesar da TNCS ser atualmente o método mais utilizado e preciso para produzir suínos geneticamente modificados, a técnica enfrenta desafios que incluem a baixa eficácia dos métodos de entrega do material genético ao genoma da célula doadora do núcleo (BRESSAN, 2008). Desta forma, o desenvolvimento de protocolos eficientes de transfecção para células de suínos doadoras de núcleo é fundamental para a consolidação da TNCS na produção de suínos transgênicos.

A maturação nuclear dos oócitos de mamíferos envolve a ruptura do envelope nuclear e a sequência de etapas que completam a meiose I (MI) até ocorrer a extrusão do 1º corpúsculo polar, atingindo a fase de Metáfase II (MII) (OTERO, 2008). A ausência do envelope nuclear, pode facilitar o contato do eDNA com a cromatina, permitindo uma maior eficiência na integração do gene de interesse ao genoma. Assim, a fisiologia dos oócitos favorece a incorporação de eDNA, o que os torna excelentes candidatos para transfecção. Ainda, nas metodologias atuais de produção de AGM os oócitos são pouco explorados, na maioria delas, eles são utilizados apenas como receptores de núcleo, como é o caso na transferência nuclear de células somáticas modificadas. Os zigotos apresentam alta taxa de divisão celular, e assim como oócitos podem ser ótimas células para transfecção. Porém, a transfecção gênica de oócitos e embriões é um desafio, por vários motivos, entre eles, a presença da zona pelúcida, camada espessa de glicoproteína que

protege estas células de agentes exteriores, e a alta sensibilidade de suas células a agentes estressores. Atualmente a metodologia de AGM mais utilizada para transfectar oócitos e zigotos é a microinjeção. Porém essa técnica é pouco eficiente, difícil de ser executada e o número de células que podem ser transfectadas é limitado (KUES; NIEMANN, 2004). O desenvolvimento de métodos alternativos e eficientes de transfecção gênica, que superem as limitações para oócitos e embriões, é de suma importância para o aprimoramento da produção de suínos transgênicos

Diante disto, o objetivo deste estudo foi desenvolver protocolos de transfecção celular eficientes e seguros, com a utilização da PEI, para fibroblastos, oócitos e embriões suínos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MÉTODOS DE TRANSFECCÃO GÊNICA

O DNA exógeno, por apresentar carga negativa, é uma macromolécula que não consegue passar facilmente pela membrana celular e integrar-se no genoma celular. Por isso, devem ser implementados métodos mecânicos, físicos ou químicos para permitir a incorporação de DNA exógeno. Por outro lado, para ser transgênico, um animal deve apresentar o DNA exógeno em todas as suas células, incluindo os gametas, para permitir a transmissão à progênie. O DNA exógeno deve, portanto, estar presente em todas as células do embrião, independentemente do método utilizado para a transferência gênica (HOUDEBINE, 2005).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o estabelecimento de um eficiente sistema transferência do DNA exógeno para a célula alvo. Os sistemas existentes incluem carreadores virais (JAENISCH et al., 1975) ou não virais, estes podendo ser classificados em métodos físicos e químicos (HSU E ULUDAG, 2012).

2.1.1 Métodos Virais

A transfecção utilizando vetores virais constitui uma importante ferramenta para a introdução de DNA em células mamíferas devido ao seu mecanismo natural de ultrapassar barreiras celulares e assumir o controle da replicação, transcrição e tradução (KUES; NIEMANN, 2011). A primeira transferência de DNA exógeno (transgene) para um mamífero, com posterior transmissão do transgene para a geração seguinte foi obtida através da infecção de embriões de camundongo com o retrovírus transmissor da leucemia (JAENISCH et al., 1975).

O uso dos lentivírus para introdução do transgene tem se consolidado como um processo mais eficiente. A transgênese lentiviral é considerada menos invasiva, e tecnicamente menos exigente. Além disso, vetores lentivirais podem infectar uma grande variedade de células de vertebrados, tornando potencialmente útil para criar animais transgênicos em numerosas espécies (PFEIFER, 2004). Diversos animais transgênicos já foram produzidos utilizando-se o sistema lentiviral, como por exemplo, ratos (MICHALKIEWICKS et al., 2007), camundongos (LOIS et al., 2002),

bovinos (HOFMANN et al., 2004), suínos (HOFMANN et al., 2003) e aves (MCGREW et al., 2004).

Apesar dos vetores virais apresentarem características interessantes, seus componentes imunogênicos, baixa capacidade de carga gênica, capacidade de causarem tumores, além da sua dificuldade de utilização em larga escala, podem limitar a utilização na produção de animais transgênicos, bem como na terapia gênica (HOUEBINE, 2002; KUES, NIEMANN, 2011).

2.1.2 Métodos físicos

2.1.2.1 Microinjeção pronuclear

Durante anos, a microinjeção de eDNA no pronúcleo de zigotos foi considerada o método de escolha para gerar um animal transgênico. A microinjeção foi desenvolvida por Gordon et al. (1980), que demonstrou que o DNA do vírus símio 40 (SV40) heterólogo ao ser microinjetado em pronúcleos de zigotos murinos integrou-se aos cromossomos, sendo capaz de replicar e ser encontrado nos tecidos da prole. A injeção pronuclear de eDNA também foi usada para produzir o primeiro animal transgênico de produção há mais de 20 anos (HAMMER et al., 1985). Desde então, a tecnologia foi aplicada a outros mamíferos como, coelhos, suínos, ovinos e bovinos (HOUEBINE, 2002). A microinjeção consiste na injeção de vários milhares de cópias de eDNA em pronúcleos de zigotos. Contudo, este método apresenta problemas que incluem a baixa eficiência (KUES; NIEMANN, 2011).

A microinjeção é um procedimento delicado que necessita equipamentos sofisticados e técnicos altamente treinados e experientes. Particularmente em suínos, a opacidade do oócito torna a visualização do seu pronúcleo difícil, requerendo que sejam centrifugados antes da microinjeção (HAMMER et al., 1985). Ainda, para a microinjeção as células são manipuladas individualmente, o que pode acarretar em danos celulares limitando o número de células transfectadas.

2.1.2.2 Eletroporação

Na eletroporação, o eDNA de interesse é incubado em solução com as células-alvo, sendo a solução submetida a um pulso elétrico de curta

duração e alta voltagem, o que provoca desestabilização e a abertura de poros transitórios nas membranas celulares, permitindo a entrada do eDNA (BRESSAN, 2008).

A eletroporação é uma técnica amplamente utilizada para a introdução de diferentes macromoléculas tais como proteínas, hidratos de carbono, partículas de vírus, DNA e mRNA em cultivo de células, tecidos vivos (BARRY, 2001; DEZAWA et al., 2002) e espermatozoides (RIETH; POTHIER; SIRARD, 2000). Ao contrário da microinjeção, onde cada célula tem de ser manipulada individualmente, a eletroporação permite a transfecção em um grande número de células ao mesmo tempo e a quantidade de eDNA não é um fator limitante. 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 (KUES; NIEMANN, 2011).

2.1.3 Métodos químicos

Problemas de imunogenicidade associados a vírus, adicionados a questões de produção em larga escala e controle de qualidade, levaram ao surgimento de vetores não virais como alternativa. Os vetores químicos condensam-se com ácidos nucléicos e formam nanopartículas para facilitar a entrega do gene, com as vantagens da menor toxicidade, bom custo-benefício, facilidade de produção e versatilidade para diferentes aplicações (MORILLE, et al, 2008). Vários vetores não-virais envolvendo lipídios, polímeros e peptídeos foram desenvolvidos para uso como carreadores não-virais de entrega de genes (WONG, PELET, PUTNAM, 2007). Os lipídios catiônicos e polímeros catiônicos estão entre os mais estudados.

Lipídeos catiônicos foram estudados inicialmente por Felgner *et al* (1987) e diversas formulações lipídicas tem sido descritas desde então, bem como variações quanto às relações de carga de lipoplexos, decorrente da molaridade do lipídio catiônico utilizado (positivo) e da molaridade do vetor plasmidial (negativo). Ambas características, composição lipídica e relação de carga, mostraram afetar a eficiência de transfecção (PARKER et al., 2003). Os lípidos catiônicos são tecnicamente simples e rápidos de formular, disponíveis comercialmente e podem ser adaptados para aplicações específicas (MORILLE, et al., 2008).

Polímeros catiônicos, denominados de poliplexos, também tem sido amplamente estudados como vetores de entrega gênica não-viral (GAO; KIM; LIU, 2007). Entre eles, a polietilenoimina é considerada um dos agentes mais eficazes, devido à sua habilidade em mediar o escape endossomal do material genético exógeno, decorrente do efeito esponja de prótons (AKINC et al., 2005).

2.1.3.1 Polietilenoimina

A PEI é um polímero catiônico, que condensa o eDNA em partículas carregadas positivamente, formando complexos que se ligam à resíduos de superfície aniônicos e são levados para dentro da célula por endocitose (GAO; KIM; LIU, 2007). Acredita-se que o poliplexo atue diminuindo a tendência de fusão endossomal, favorecendo a entrada do eDNA no núcleo (KUNATH et al., 2003). Além disso, apresentam toxicidade limitada e boa eficácia *in vitro* (MAURISSE et al., 2010). Os complexos PEI/eDNA podem ser adicionados diretamente ao meio de cultura contendo as células, sem a necessidade de dispositivos especializados ou equipamentos caros. Ainda, a PEI apresenta melhor relação custo-benefício quando comparado a outros polímeros (FUKUMOTO et al., 2010). Desta forma, a PEI pode oferecer uma opção mais acessível e segura para transfecção celular.

A aplicação de PEI como reagente de transfecção celular foi relatada pela primeira vez por Boussif et al. (1995) que demonstrou que a PEI foi capaz de transferir eDNA para o cérebro de ratos recém-nascidos, dando assim a primeira evidência para a aplicação *in vivo* do polímero. Desde então, vários estudos têm descrito o uso da polietilenoimina (PEI) como um bom agente transfectante numa ampla gama de tipos celulares (YAMANO; DAI; MOURSI, 2010) e para terapia gênica (SHARMA et al., 2011). No estudo realizado por Dang et al. (2011), foram transfectadas células de ovário de hamster (CHO), células embrionárias de rim humano (HEK293T) e fibroblastos de rim de macaco (COS) com PEI, onde observaram-se eficiências que variaram de aproximadamente 20% a quase 40%. Em espermatozoides suínos, nanopartículas magnéticas revestidas com PEI, comercialmente disponível como Polymag-1000® (Chemicell, Alemanha), foram testadas por Fang et al. (2017). Estes autores conseguiram obter suínos transgênicos para o gene *PID1* (Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1), com 29,16% de eficiência.

A eficácia da PEI e seus efeitos citotóxicos dependem em grande parte de características do polímero como peso molecular, grau de ramificação, densidade de carga catiônica, propriedades polipeptídicas, tais como o conteúdo de eDNA, tamanho de partícula e potencial zeta, além das condições experimentais como a concentração de poliplexo, a presença ou ausência de soro durante a transfecção, o tempo de incubação e o modelo de transfecção escolhido para a entrega de genes. (HSU E ULUDAG, 2012).

2.1.3.1.1 Mecanismo de ação da PEI

A PEI, é um polímero catiônico com alta densidade de carga positiva, e está entre os sistemas de entrega de genes mais eficientes. A PEI é capaz de condensar eDNA aniônico em nanopartículas carregadas positivamente formando poliplexos ligeiramente catiônicos. Esse poliplexo interage com membranas celulares de carga negativa, e são internalizados por endocitose, através da ligação com protoglicanos (MISLICK; BALDESCHWIELER, 1996). A liberação dos complexos PEI-eDNA ocorre no citoplasma após sofrerem o escape endossomal pelo mecanismo conhecido como “efeito esponja de prótons” (BOUSSIF et al., 1995).

Devido seus grupos primários, secundários e terciários, a PEI demonstra uma alta capacidade de tamponamento em uma ampla faixa de pH. Assim, poliplexos presentes no endossomo podem absorver os prótons que são bombeados para dentro desta organela, e devido à protonação e conseqüentemente a repulsão dos grupos amino protonados, ocorre o intumescimento do polímero. Desta forma, a PEI previne a acidificação nos endossomos e facilita o escape endossomal dos complexos e, portanto, o eDNA é protegido da degradação mediada por nucleases nos lisossomos. Além disso, para manter a neutralidade de cargas dentro do endossomo ocasionado pelo fluxo de prótons, ocorre também um fluxo equivalente de íons cloreto (Cl⁻). A entrada de ambos, prótons e íons cloreto, aumenta a osmolaridade do endossomo e causa uma maior absorção de água. A combinação do intumescimento do polímero e do inchaço osmótico do endossomo leva a desestabilização do mesmo e resulta no seu rompimento, com conseqüente liberação do seu conteúdo no citoplasma (BOUSSIF et al., 1995; FUNHOFF et al., 2004; AKINC et al., 2005; LUNGWITZ et al., 2005, PANDEY; SAWANT, 2016).

Outra possível explicação para o escape endossomal seria que a protonação de moléculas de PEI dentro das vesículas lisossomais levem à uma expansão de sua estrutura polimérica causando a ruptura física da membrana vesicular (BEHR, 1997). Adicionalmente, foi proposto que a carga positiva presente na estrutura de moléculas de PEI mimetiza sinais de localização nuclear (*nuclear localization signals* - NLS) o que poderia também contribuir para a maior eficiência de transfecção e pelo fato de que complexos de PEI-eDNA serem capazes de transfectar células que não estão em divisão (BRUNNER *et al.*, 2002).

2.1.3.1.2 Citotoxicidade

Protocolos de transfecção gênica mediados por PEI usam complexos catiônicos com excesso de PEI para manter o equilíbrio entre as formas complexas e dissociadas na solução de transfecção (LEE, 2007), pois, a eficiência da transfecção depende da quantidade de PEI que permanece na forma livre (CLAMME, AZOULAY E MÉLY, 2003). A presença de PEI livre é essencial para a modificação e permeabilização da estrutura da membrana endossomal (KLEMM, YOUNG, LLOYD, 1998). Porém, o excesso de moléculas livres de PEI está relacionada a citotoxicidade.

Foi relatado a existência de dois diferentes tipos de citotoxicidade envolvidas na entrega de genes mediada por PEI, uma imediata e outra tardia. A citotoxicidade imediata está associada com a quantidade de PEI livre, e afeta quase imediatamente as células. Enquanto a tardia está associada com processamento celular de complexos PEI/eDNA e leva mais tempo (entre 7 e 9 h), possivelmente ligada à presença do PEI no núcleo (GODBEY, WU E MIKOS, 1999). Estudos em mostraram que a toxicidade imediata está ligada a rápida liberação de lactato desidrogenase (LDH) e translocação de fosfatidilserina da membrana plasmática interna para a superfície celular externa. E a toxicidade tardia relacionada a apoptose celular mediada por mitocôndria. O processo apoptótico foi associado à liberação de citocromo c, após ativação caspases 9 e 3 (MOGHIMI, *et al.*, 2005).

Lee (2007), avaliando a citotoxicidade mediada por PEI em células 293 de rim embrionário humano, identificou que o complexo PEI/eDNA acarretou em toxicidades imediatas e tardias, enquanto que a exposição a PEI-livre (sem complexação) induziu apenas toxicidade imediata. O autor sugeriu que, os

agregados de PEI-livre na superfície da membrana plasmática podem romper a célula, induzindo a toxicidade imediata. Enquanto a citotoxicidade tardia pode ser relacionada intimamente com a descomplexação da PEI/eDNA. Foi sugerido que a PEI dissociada pode interagir com vários componentes celulares com cargas negativas. Essa interação pode interferir nas funções celulares normais e induzir a apoptose. Portanto, a citotoxicidade do complexo PEI/eDNA pode ser estreitamente relacionados ao nível de expressão gênica na região mediada pela PEI (LEE, 2007).

Okon e colaboradores (2014) pesquisaram a citotoxicidade de diferentes tipos de PEI (PEI ramificada 800D e 25kD e PEI linear 20kD) em células HeLa e Vero, expostas a diferentes concentrações de PEI (0,5 -1000 mg/mL) e avaliadas por MTT após 24, 48 e 72 horas. O autor verificou que a toxicidade foi dependente do tipo de PEI, linhagem celular, concentração e foi dependente do tempo. A PEI linear foi menos tóxica que as ramificadas, em ambas as células. Todos os três polímeros avaliados demonstraram ser mais tóxicos para HeLa do que as células Vero. A maior toxicidade foi encontrada no tempo de 72 horas, com diferença significativa para os três polímeros e ambas as linhagens celulares (OKON *et al.*, 2014).

Khansarizadeh *et al.* (2015), estudando a PEI em células de adenocarcinoma colorretal humano (HT29), verificou que a maioria das proteínas que interagem com PEI, como proteínas de choque, glutathione transferase e dissulfeto isomerase de proteínas estão envolvidas no processo de apoptose em células.

Ficou evidente que a PEI leva a processos de necrose e apoptose, porém diferentes estudos demonstram que a citotoxicidade também depende do tipo de célula, grau de ramificação, concentração e tempo de incubação (MOGHIMI, *et al.*, 2005; LEE, 2007; KAFIL, 2011; OKON, *et al.*, 2014). Desta forma, o desenvolvimento de protocolos de transfecção mediados por PEI devem ser otimizadas especificamente para cada tipo celular, levando em considerações todos os parâmetros citados, visto, que a toxicidade da PEI está intimamente ligada a eficiência da transfecção.

3 REFERÊNCIAS

AKINC, A. *et al.* Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med.*, v.7 p.657-63, maio. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543529>. Acesso em: 11 nov. 2018.

ARAT, S. *et al.* In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biololy of Reproduction**, v. 66, p. 1768–1774, jun. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021060>. Acesso em: 11 nov. 2019.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p. 101–114, set. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500256>. Acesso em: 19 out. 2018.

BEHR, J. P. The Proton Sponge: A Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. **CHIMIA International Journal for Chemistry**. v.51, p.33-36, jan.1997. Disponível em:<https://www.ingentaconnect.com/content/scs/chimia/1997/00000051/f0020001/art00026>. Acesso em: 20 nov. 2018.

BENDIXEN, E. K. *et al.* Advances in porcine genomics and proteomics - A toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. **Brief Funct Genomics**, v. 9, p. 208-219. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495211>. Acesso em: 17 nov. 2018.

BOUSSIF, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 92, n. 16, p. 7297–7301, ago. 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638184>. Acesso em: 25 out. 2018.

BRESSAN, F. F. **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-30072008-090317/publico/Fabiana_Fernandes_Bressan.pdf. Acesso em: 23 jan. 2019.

BRUNNER, S. *et al.* Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther.* v.5, .80-86, jan. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786049>. Acesso: 20 nov. 2018.

CABOT, R. A. *et al.* Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. **Animal Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 205–214, nov. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11808636>. Acesso em: 29 out. 2018.

CHAN, A. W. *et al.* Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. **Science**, v. 291, n. 5502, p 309-312, jan. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11209082>. Acesso em: 19 nov. 2018.

CHAN, A. W. S. *et al.* Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer into oocytes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 95, p. 14028-14033, nov. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24320/>. Acesso em: 15 nov. 2018.

CLAMME, J. P.; AZOULAY, J.; MÉLY, Y. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. **Biophys J.** v.84, p.1960-1968, mar. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609898>. Acesso em: 15 nov. 2018.

DEZAWA, M. *et al.* Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. **Micron**, v. 33, p. 1–6, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473808>. Acesso em: 30 out. 2018.

FANG, Guo-Feng. *et al.* Generation of Transgenic Pigs Overexpressing PID1 Gene Mediated by Magnetic Nanoparticles and Sperm. **Asian J. Anim. Vet. Adv.**, v. 12, n. 3, p. 161-168, 2017. Disponível em: <https://scialert.net/fulltext/?doi=ajava.2017.161.168>. Acesso em: 30 out. 2018.

FELGNER P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.84, p.7413-7417, nov.1987. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2823261>. Acesso em: 03 nov. 2018.

FISCHER, D. *et al.* A novel nonviral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. **Pharm. Res.**, v. 16, n. 8. p. 1273–1279, ago. 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1014861900478>. Acesso em: 29 out. 2018.

FUKUMOTO, Y. *et al.* Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. **Cytotechnology**, v. 62, n. 1, p. 73-82, jan. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309632>. Acesso em: 23 nov. 2018.

FUNHOFF, A. M. *et al.* Poly(3-guanidinopropyl methacrylate): A Novel Cationic Polymer for Gene Delivery. **Bioconjugate Chem.** v.15, p.1212-1220, nov.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546186>. Acesso em: 23 nov. 2018.

GAO, X.; KIM, K.S.; LIU, D. Nonviral gene Delivery: What we know and what is next. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 92-104, mar. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408239>. Acesso em 17 dez. 2019.

GODBEY, W. T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.96, p.5177-5181, abril.1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220439>. Acesso em: 20 dez. 2018.

GORDON, J. W. *et al.* Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 77, n. 12, p. 7380–4, dez. 1980. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261253>. Acesso em: 13 out. 2018.

HAMMER, R. E. *et al.* Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680–683, jun. 1985. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/315680a0>. Acesso em: 15. nov. 2018.

HEYMAN, Y. *et al.* Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses From Cattle Cloned Embryos. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 6-13, jan. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751257>. Acesso em: 12 jan. 2019.

HOUDEBINE L. M. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. **J Biotechnol**, v.98, p.145-160, set. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141984>. Acesso em: 18 de out. 2018.

HOUDEBINE, L. M. *Métodos de gerar animais transgênicos e controle da expressão gênica*. In: COLLARES, T. **Animais transgênicos: Princípios e Métodos**. Botucatu, SBG, p. 81-114, 2005.

JAENISCH, R.; FAN, H.; CROKER, B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.72, n.10, p.4008-4012, out.1975. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060083>. Acesso em: 20 nov. 2018.

KAFIL, V., OMIDI, Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in a431 cells. **Bioimpacts**. v.1, p.23-30, jun. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678404>. Acesso em: 20 nov. 2018.

KAMSTOCK, D. *et al.* Liposome-DNA complexes infused intravenously inhibit tumor angiogenesis and elicit antitumor activity in dogs with soft tissue sarcoma. **Cancer Gene Ther.**, v. 13, n. 3, p. 306-317, mar. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138118>. Acesso em: 13 out. 2018.

KLEMM, A.R., YOUNG, D., LLOYD, J.B. Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. **Biochem Pharmacol**. v. 56, p.41-46, jul.1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698087>. Acesso em: 13 de out. 2018

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 286-294, jun. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158058>. Acesso em: 23 nov. 2018.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 146-156, nov 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21601297>. Acesso em: 23 nov. 2018

KUNATH, A. *et al.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and

in vivo distribution with highmolecular-weight polyethylenimine. **J. Controll. Rel.**, v. 89, p. 113– 125, abr. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695067>. Acesso em: 13 nov. 2018.

KUNATH, K. *et al.* Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 88, n. 1, p. 159-172, fev. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586513>. Acesso em: 16 dez. 2018.

LAVITRANO, M. *et al.* Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 284–291, mar. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548661>. Acesso em: 19 out. 2018.

LEE, G. S. *et al.* Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. **Theriogenology**, v. 59, p. 1949–1957, maio 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600732>. Acesso em: 24 jan. 2019

LEE, M. Apoptosis Induced by Polyethylenimine/DNA Complex in Polymer Mediated Gene Delivery. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 28, n. 1. Nov. 2007. Disponível em: http://journal.kcsnet.or.kr/main/j_search/j_download.htm?code=B070116. Acesso em: 13 dez. 2018.

LEMKINE G. F.; DEMENEIX B. A. Polyethylenimines for in vivo gene delivery. **Curr Opin Mol Ther.**, v. 3, n. 2, p. 178-182, abr. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11338931>. Acesso em: 13 out. 2018.

LOIS, C. *et al.* Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 868-872, fev.2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786607>. Acesso em: 23 de nov. 2018

MAURISSE, R. *et al.* Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. **BMC Biotechnology**, v. 10, p. 1-9, fev. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144189>. Acesso em: 17 nov. 2018.

MCGREW, M. J. *et al.* Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **EMBO Reports**, v. 5, n. 7, p. 728-733, jul. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192698>. Acesso em: 03 de nov. 2018.

MISLICK K.A, BALDESCHWIELER J.D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. **Proc Natl Acad Sci.** v.93 p.12349-12349-12354, out. 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901584>. Acesso em: 12 out. 2018.

MITTERMEYER, G. *et al.* Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. **Hum. Gene Ther.**, v. 23, n. 4, p.377-381, abr. 2012.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424171>. Acesso em: 12 out. 2018.

MOGHIMI S. M. *et al.* A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. **Mol Ther**, v. 11, p. 990–995, jun. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922971>. Acesso em: 15 nov. 2018.

MORILLE. M. *et al.* Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against câncer. **Biomaterials**, v.29, p. 3477–3496, maio. 2008. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499247>. Acesso em: 15 dez. 2018.

OKON, E. U. *et al.* *In-vitro* cytotoxicity of Polyethyleneimine on HeLa and Vero Cells. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 5, n. 3, p. 192-199, mar.2014. Disponível em: https://www.staffs.ac.uk/assets/In-vitro%20cytotoxicity%20of%20Polyethyleneimine%20on%20HeLa%20and%20Vero%20Cells_tcm44-87412.pdf. Acesso em: 16 dez. 2018.

OTERO, A. R. J. **Classificação de Ovócitos Imaturos de Bovinos pela Utilização do Azul Cresil Brilhante**. 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/4962>. Acesso em: 17 nov. 2018.

PANDEY A.P, SAWANT, K. K. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. v.68 p.904-918. nov. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27524093>

PARK, Kwang-Wook. *et al.* Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. **Animal Biotechnology**, v. 12, p. 173–181. fev. 2001. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/ABIO-100108344?journalCode=labt20>. Acesso em: 24 nov. 2018.

PARKER A. L. *et al.* Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. **Expert Rev Mol Med.**, v. 5, n. 22, p. 1-15, set. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585173>. Acesso em: 22 out. 2018

PFEIFER, A. Lentiviral transgenesis. **Transgenic Research**, v. 13, p. 513-522, dez.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15672832>. Acesso em: 20 nov. 2018.

RIETH, A.; POTHIER, F.; SIRARD, M.A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 338-45, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11066062>. Acesso em: 14 out. 2018.

RÜLICHE, T. *et al.* FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 301-311, jul. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640457>. Acesso em: 13 nov. 2018.

RUMPF, R.; MELO, E. O. Produção de Animais Transgênicos: metodologias e aplicações. *In: Documentos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília: Distrito Federal, 2005. 145, p. 27. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/26530/1/doc145.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2018.

SHARMA, A. *et al.* Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 7, n. 4, p. 505-513, ago. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272669>. Acesso em: 15 nov. 2018.

SHARON, Y. W., JEISA M., PELETB, D.P. Polymer systems for gene delivery — Past, present, and future. *Progress in Polymer Science*. v.32, p.799-837, set. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670007000718>. Acesso em: 20 nov. 2018.

TOLEDO, J. R. *et al.* Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 157, n. 3, p. 538-544, jun. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089654>. Acesso em: 15 out. 2018.

VAJTA, G.; ZHANG, Y.; MACHÁTY, Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 2, p. 403–423, jan. 2007. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/RD/RD06089>. Acesso em: 15 out. 2018.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-51, abr. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763114>. Acesso em: 25 nov. 2018.

WHITELAW, C. B. *et al.* Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. **FEBS Letters**, v. 571, n. 1–3, p. 233–236, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280048>. Acesso em: 16 nov. 2018.

YAMANO, S.; DAI, J.; MOURSI, A. M. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 287-300, nov. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585901>. Acesso em: 25 nov. 2018.

4 CAPÍTULO 1: TRANSFEÇÃO GÊNICA DE FIBROBLASTOS FETAIS SUÍNOS MEDIADA POR POLIETILENOIMINA

RESUMO

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é atualmente o método mais utilizado para produzir suínos geneticamente modificados. Porém, a taxa de sucesso permanece menor do que em outras espécies. Neste sentido, o desenvolvimento de protocolos eficientes de transfecção para células de suínos doadoras de núcleo é fundamental para a consolidação da TNCS na produção de suínos transgênicos. Os polímeros catiônicos como a polietilenoimina (PEI) se destacam como uma alternativa para entrega segura e eficiente de genes, devido sua boa biocompatibilidade, versatilidade e tamanho controlável de moléculas, além disso, são baratos e simples de preparar. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações, tempo de incubação e razão polímero/eDNA visando desenvolver um protocolo utilizando o polímero catiônico, polietilenoimina como agente de transfecção de eDNA em fibroblastos fetais suínos. No experimento 1 foi avaliada a capacidade da PEI de ser internalizada nos fibroblastos fetais suínos em diferentes concentrações (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80µg/mL) por incubação em diferentes períodos (0,5; 1 e 2 horas), para isso a PEI foi conjugada com o fluoróforo FITC. O experimento 2 foi realizado para determinar melhor razão polímero/eDNA, sendo o grau de complexação avaliado por eletroforese em gel de agarose. No experimento 3, os fibroblastos fetais foram transfectados utilizando a combinação dos resultados dos experimentos anteriores, sendo a transfecção gênica dos fibroblastos realizada utilizando-se duas preparações de poliplexo. O poliplexo 1 foi preparado utilizando 10µg/mL de PEI e o poliplexo 2 na concentração de 40µg/mL de PEI, ambos se utilizando da razão de PEI/eDNA igual a 2. O tempo de incubações das células com os poliplexos foi de 0,5h. Não foi verificada diferença na porcentagem de FFS que expressaram a proteína verde fluorescente entre as concentrações de PEI/eDNA utilizadas, sendo as taxas encontradas foram de 13,23% ±0,73 e 12,26% ±0,73, para os grupos poliplexos 1 e 2 respectivamente. Além disso, foi verificado que a porcentagem de FFS que expressaram GFP foi semelhante ao longo de 3 dias de avaliação (24h - 14,32%±0,89; 48h - 12,23%±0,89 e 72h - 11,10%±0,89 dos FFS expressaram proteínas verde fluorescente). Quanto a integridade de membrana plasmática, não foi observada lesão de membrana significativa para a concentração 10µg/mL nos períodos avaliados, entretanto, a concentração 40µg/mL apresentou altos índices de lesão de membrana nos períodos de 24 e 72 horas pós transfecção (52,01%±3,36 e 43,43%±3,36 respectivamente). Conclui-se que o protocolo de transfecção constituído por PEI na concentração de 10µg/mL, combinado com a razão N/P de 2, com incubação de 0,5h, foi capaz de transfectar com sucesso fibroblastos fetais suínos, sendo que a porcentagem de células GFP positiva se manteve constante ao longo do tempo avaliado, sem causar lesão de membrana significativa nos fibroblastos.

Palavras-chave: Polímero catiônico. Vetores não virais. Transgenia.

4.1 INTRODUÇÃO

Suínos transgênicos ganharam grande importância nos últimos anos pois além da importância zootécnica, existe o crescente interesse pela espécie na pesquisa biomédica pelo fato de haver grande similaridade com o ser humano no tamanho, fisiologia e metabolismo dos órgãos, bem como na sequência de genes. A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é atualmente o método mais utilizado para produzir suínos geneticamente modificados. Porém, a taxa de sucesso permanece menor do que em outras espécies (MUENTHAISONG et al., 2011). A TNCS associada a transgênese combina a técnica de clonagem por transferência nuclear com a transgenia, gerando animais transgênicos clonados. Para isso, uma célula previamente modificada geneticamente é transferida para oócitos enucleados (LI et al., 2009). Assim, a célula doadora tem um papel fundamental na TNCS associada a transgênese, podendo determinar o sucesso do procedimento. Dentre as células somáticas que já foram usadas no processo de transferência, estão as células da glândula mamária, fibroblastos fetal e adulto, células da granulosa mural, células da tuba uterina, células do cúmulus, células tronco embrionárias e células de Sertoli (ARAT et al., 2002; POWELL et al., 2004; CAMPBELL et al., 2007; NEVES et al., 2010). Devido ao seu rápido crescimento e potencial proliferativo, os fibroblastos fetais têm sido o principal tipo celular usado (KUHHLZER et al., 2000). Além disso, as células somáticas fetais usualmente são mais fáceis de serem reprogramadas do que células adultas (HEYMAN et al., 2002). Lee et al. (2003) demonstraram que a utilização de fibroblastos fetais na TNCS de suínos, resulta em melhor desenvolvimento embrionário quando comparado a qualquer célula doadora adulta. Porém, a produção de células doadoras de núcleo transgênicas depende de um método eficiente de transfecção. A TNCS associada a transgênese enfrenta desafios que incluem a baixa eficácia dos métodos de entrega do material genético ao genoma da célula doadora do núcleo (BRESSAN, 2008). Desta forma, a identificação de um sistema barato, simples e eficiente para entrega de eDNA em células doadoras de núcleo impactariam positivamente nas metodologias transgênicas baseadas em TNCS.

Entre os métodos disponíveis para a entrega de genes em células doadoras de núcleo, estão, a eletroporação (ANDREASON; EVANS, 1989), o uso de vetores lentivirais (BRESSAN, 2008), lipofecção (FELGNER et al., 1987) e de polímeros

catiônicos (PHAM; KAMEN; DUROCHER, 2006). Os polímeros catiônicos como a polietilenoimina (PEI) se destacam como uma alternativa para entrega segura e eficiente de genes, devido à sua boa biocompatibilidade, versatilidade e tamanho controlável de moléculas, além disso, são baratos e simples de preparar (LUNGWITZ et al., 2005). A PEI condensa o eDNA em partículas carregadas positivamente, formando complexos que se ligam à resíduos de superfície aniônicos e são levados para dentro da célula por endocitose (GAO; KIM; LIU, 2007). Entre eles, a polietilenoimina é considerada um dos agentes mais eficazes, devido à sua habilidade em mediar o escape endossomal do material genético exógeno decorrente do efeito esponja de prótons (AKINC et al., 2005). Apesar de apresentarem muitas vantagens, a eficiência de entrega depende da otimização de parâmetros como concentração, tempo de incubação, razão de polímero/plasmídeo, que precisam ser otimizadas para cada tipo celular. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações, tempo de incubação e razão polímero/eDNA visando desenvolver um protocolo utilizando o polímero catiônico, polietilenoimina, como agente de transfecção de eDNA em fibroblastos fetais suínos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes e químicos

Exceto quando indicado, todos os reagentes utilizados para este experimento, bem como os produtos químicos para a preparação dos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

4.2.2 Preparação da PEI

Para realização dos experimentos foi utilizada polietilenoimina ramificada com um peso molecular de 25 kDa. A solução estoque de 18mM de polietilenoimina foi preparado diluindo 16,2 mg/mL de PEI em 20 mL de PBS com pH ajustado para 7.

4.2.3 Conjugação PEI-FITC

A conjugação da PEI com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi realizada de acordo com Saito e Saitoh (2012). Para isso foram preparadas duas soluções. A primeira solução, de PEI a 20 mg/mL em PBS, a qual foi mantida sob refrigeração (4-8 °C) por 24 horas. A segunda solução, de FITC diluído em DMSO na concentração de 10 mM. As soluções foram misturadas para obtenção da concentração final de 0,1 mM de FITC, e mantidas sob agitação por 2,5 horas para completa conjugação. A solução resultante foi dialisada em 1 litro de PBS gelado por 24 horas, para remoção de partículas de FITC não ligadas a PEI.

4.2.4 Cultivo celular

Fetos suínos de aproximadamente 50 dias de idade foram obtidos em abatedouro e transportados em frascos estéreis até o laboratório. Sob fluxo laminar, os fetos foram retirados do saco amniótico e transferidos para placas de petri estéreis. Fragmentos de pele foram removidos assepticamente e lavados 3 vezes em PBS com antibiótico (50 UI/mL de gentamicina) em seguida foram cortados em pequenas frações de 2 a 3 mm e transferidos para placas de Petri (35mm) cobertas com 2 mL de DMEM (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 50 UI/mL de gentamicina (DMEM suplementado). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Após 3 dias de cultivo, foi adicionado 1 mL do meio de cultura fresco em cada placa, tomando o cuidado para não descolar os fragmentos do fundo da placa de Petri. Ao observar aproximadamente 40% de confluência, os fragmentos foram retirados cuidadosamente. A identificação dos fibroblastos foi realizada através da avaliação morfológica em microscopia óptica. Os fibroblastos permaneceram em cultivo até atingirem aproximadamente 90% de confluência, quando foram tratados com tripsina (tripsina 0,25%, EDTA 0,025% em PBS sem cálcio e magnésio) e replaqueados sucessivamente até atingir a 3ª passagem, sendo congelados em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfoxido (DMSO). Para os protocolos experimentais, os fibroblastos foram descongelados e cultivados até atingirem 80% de confluência, quando foram tripsinizados e submetidos aos protocolos experimentais.

4.2.5 Experimento 1: Avaliação da internalização da PEI-FITC

Na transferência gênica mediada por polietilenoimina, a internalização celular do DNA exógeno presente nos poliplexos ocorre por endocitose. O excesso de cargas superficiais positivas da PEI aumenta a associação do poliplexo com a membrana plasmática das células e facilita a sua captação. A eficácia da captação celular pode ser melhorada através da otimização de alguns parâmetros como tempo de incubação e/ou da concentração do polímero (HSU e ULUDAG, 2012). Desta forma, o objetivo deste experimento foi avaliar a eficiência de captação celular de fibroblastos fetais suínos. Para isso, a PEI foi conjugada ao fluoróforo FITC, e a porcentagem de FFS que captaram a PEI foi avaliada por citometria de fluxo.

Após o descongelamento, os FFS foram cultivados em garrafas de 25 cm² contendo DMEM suplementado. Ao atingirem 80% de confluência, os FFS foram tratados com tripsina (tripsina 0,25%, EDTA 0,025% em PBS sem cálcio e magnésio) e 2x10⁵ células foram semeadas em placas de Petri (35mm) para compor os tratamentos. Os FFS foram cultivados por aproximadamente 48h em meio DMEM suplementado. O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Ao atingirem 80% de confluência, o meio de cultura foi substituído por DMEM (desprovido de SFB e antibiótico) suplementado com oito diferentes concentrações de PEI conjugado com FITC (PEI-FITC), sendo 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 ou 80µg/mL. As células foram expostas as concentrações de PEI-FITC por 3 tempos diferentes, sendo, 0,5h, 1h ou 2h. Ao final de cada período, o meio de cultura foi retirado e a placa lavada com DMEM suplementado. Em seguida as células foram removidas da placa com auxílio de scrap. As células foram avaliadas através de citometria de fluxo (BD Accuri™C6). Para mensuração da porcentagem de células que captaram PEI-FITC foram analisados 10.000 eventos na seleção (gate) de fibroblastos fetais suínos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). A porcentagem de células marcadas com FITC foi avaliada no canal FL1 (FL1: 533 ± 30 nm). Foram totalizadas 4 repetições por tratamento. As concentrações e o tempo que proporcionaram melhores taxas de internalização foram avaliadas quanto a integridade de membrana plasmática.

4.2.6 Experimento 2: Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética

4.2.6.1 Construção, amplificação e purificação do vetor

O plasmídeo utilizado foi o vetor com integração baseada em transposase PiggyBac, (pmhyGENIE-5), o qual contém a transposase hiperativa de piggyBac de mamífero e que codifica a proteína verde fluorescente melhorada (eGFP). O plasmídeo pmhyGENIE-5 foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Stefan Moisyadi, da Universidade do Havaí (Honolulu, Havaí, EUA).

O pmhyGENIE-5 foi inserido em bactérias *E. coli* competentes (*DH5 α* ou *DH10 β*), segundo Esteves (2001) com modificações. A seleção dos clones foi obtida pela presença de canamicina em meio Luria-Bertani (LB), referente ao marcador de resistência a este antibiótico contido no plasmídeo construído, o gene KAN(R). O eDNA foi isolado utilizando Kit mini preparação plasmidial (miniprep) QIAprep (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme orientações do fabricante.

3.2.6.2 Eletroforese em gel de agarose

Um dos fatores determinantes na transfecção gênica utilizando polietilenoimina é identificar a razão ótima entre polímero e o eDNA, também chamado de razão nitrogênio/fosfato (N/P). Visto que, a internalização e a estabilidade do eDNA dentro das células depende do grau de complexação destes elementos. Neste sentido, o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética configura-se como uma importante ferramenta para se estudar a interação entre a PEI e o eDNA. A técnica de eletroforese em gel de agarose permite avaliar a estabilidade dos complexos formados em função da razão N/P, a partir da análise da mobilidade do eDNA na matriz de gel, quando esta é submetida a um campo elétrico. A molécula de eDNA possui carga negativa então tende a migrar para o pólo positivo, enquanto que à medida que os políplexos vão sendo formados, a interação eletrostática entre o eDNA e os polímeros catiônicos começa a ser tão significativa que todo o eDNA fica complexado e não se visualiza a migração do mesmo em direção ao pólo positivo (SEMENSATO,2014).

Para o ensaio de mobilidade eletroforética, os sistemas foram preparados utilizando-se diferentes proporções polímero/eDNA (razão N/P). O cálculo da razão N/P considerou que 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de eDNA contém 3 nmol de fosfato e que cada 1 mM/ μL

de PEI contém 1 nmol de amina. Os sistemas estudados foram preparados para as seguintes razões N/P: 0,48; 0,6, 0,72; 0,84; 1; 2; 3 e 4. A partir destes dados foram calculadas as adições de PEI (0,26 mM/ μ L) necessárias para cada razão, utilizando uma quantidade fixa de 3 μ L eDNA (120 ng/ μ L). Após 15 minutos, as amostras foram aplicadas num gel de agarose 2%, contendo 5 μ L de brometo de etídio (10mg/mL) em tampão Tris/Borato/EDTA, (TBE) e corridos a 80 map, 100 V por 60 minutos, sendo a visualização do eDNA foi feita com iluminação UV (254 nm). O padrão de 1 kb e de 100 pb de marcador molecular de DNA foi utilizado para marcar o tamanho do DNA.

4.2.7 Experimento 3: Transfecção de fibroblastos fetais suínos

4.2.7.2 Preparação dos poliplexos

Os experimentos anteriores foram realizados para otimizar os parâmetros de produção dos poliplexos afim de garantir melhores resultados na transfecção de fibroblastos fetais suínos. Os poliplexos foram preparados utilizando a combinação dos parâmetros otimizados nos experimentos anteriores. Foram escolhidas para transfecção as concentrações 10 e 40 μ g/mL de PEI. A concentração de 10 μ g/mL foi a menor concentração de PEI que possibilitou alta taxa de internalização de PEI. E a concentração de 40 μ g/mL foi selecionada porque não diferiu da concentração de 80 μ g/mL, e ambas proporcionaram as maiores taxas de internalização. A razão de N/P de 2 foi selecionada porque foi observado que não existiam cargas negativas provenientes dos grupos fosfatos presentes no eDNA, e acredita-se que há PEI livre para interagir com a membrana plasmática. Desta forma, foram produzidos 2 poliplexos:

- Poliplexo 1: 10 μ g/mL de PEI complexado com 37,5 μ g/mL de pmhyGENIE-5 (razão N/P=2), preparados em DMEM (sem SFB e antibiótico).
- Poliplexo 2: 40 μ g/mL de PEI, complexadas com 150 μ g/mL de pmhyGENIE-5 (razão N/P=2), preparados em DMEM (sem SFB e antibiótico).

4.2.7.3 Transfecção

Após o descongelamento, os fibroblastos foram cultivados em garrafas de 25 cm² contendo DMEM suplementado por aproximadamente 48h. Ao atingirem 80% de confluência, os FFS foram tratados com tripsina (tripsina 0,25%, EDTA 0,025% em PBS sem cálcio e magnésio) e 2x10⁵ células foram semeadas em placas de 24 poços com DMEM suplementado. O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Ao atingirem 70% de confluência (aproximadamente 24 horas) os fibroblastos foram distribuídos para compor os tratamentos:

- Controle: FFS incubados com 200µL DMEM sem SFB (sem poliplexo) por 0,5h;
- INC10: FFS incubados 200µL de pmhyGENIE-5 (37,5µg/mL) (sem exposição a PEI) por 0,5h;
- INC40: FFS incubados 200µL de pmhyGENIE-5 (150µg/mL) (sem exposição a PEI) por 0,5h;
- PEI10: FFS incubados com 200µL de poliplexo 1 por 0,5h;
- PE40: FFS incubados com 200µL de poliplexo 2 por 0,5h;

4.2.7.4 Avaliação da expressão da GFP e da integridade de membrana citoplasmática

A expressão do GFP e a integridade de membrana citoplasmática foram avaliadas às 24, 48 e 72 horas pós o início da transfecção através de citometria de fluxo (BD Accuri™C6). Para isso, as células foram removidas com auxílio de scrap, centrifugas (700g/5 minutos) e ressuspensas em 100µL de DMEM suplementado e avaliadas imediatamente. Para avaliação da integridade de membrana citoplasmática, 50 µL da suspensão celular foram incubados por 10 minutos com iodeto de propídio (50µg/mL) e posteriormente avaliadas. Foram analisados 10.000 eventos na seleção (gate) de fibroblastos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). A porcentagem de células que expressaram GFP foram avaliadas no canal FL1 (FL-1: 3533 ± 30 nm) e integridade de membrana no canal FL2 (FL2: 585 ± 40 nm).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A porcentagem de FFS que internalizaram a PEI-FITC, porcentagem de FFS que expressaram GFP, porcentagem de FFS com lesão de membrana e interação entre as concentrações de PEI estudadas e o tempo de incubação/avaliação pós transfecção, foram avaliados por ANOVA usando PROC MIXED (SAS®). Foi utilizado o LSMEANS (média dos quadrados mínimos) para obtenção das médias ajustadas dos tratamentos, com comparações utilizando-se o Teste Tukey com 5% de significância. Os dados foram apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP.

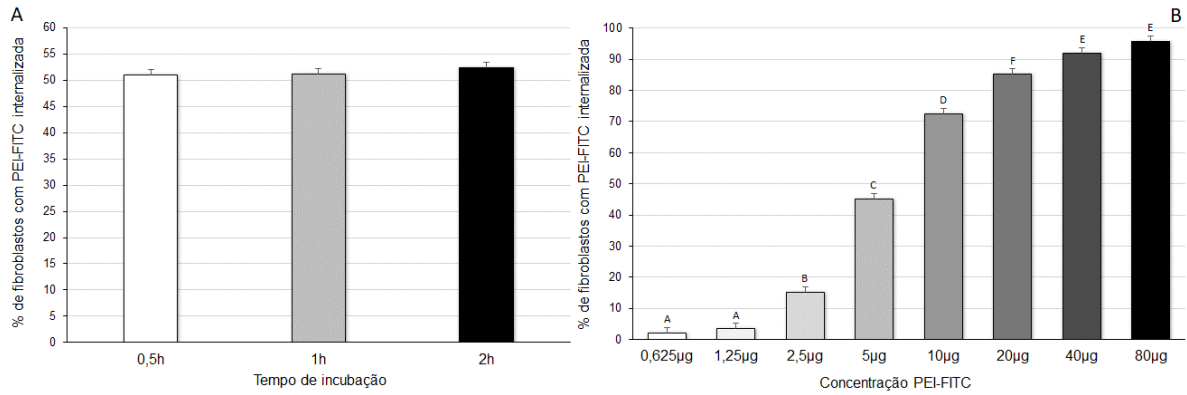
4.4 RESULTADOS

4.4.1 Experimento 1: Avaliação da internalização da PEI-FITC

Não houve interação entre o tempo de incubação e a concentração da PEI/FITC ($p=0,9890$). A internalização da PEI/FITC não foi afetada pelo tempo que os fibroblastos permaneceram em contato com o polímero ($p=0,6200$), sendo que no tempo de 0,5h, $50,94\% \pm 1,06$ das células apresentaram marcação com FITC, o tempo de 1h apresentou $51,10\% \pm 1,06$; enquanto o tempo 2h de $52,29\% \pm 1,06$ (Figura 1A).

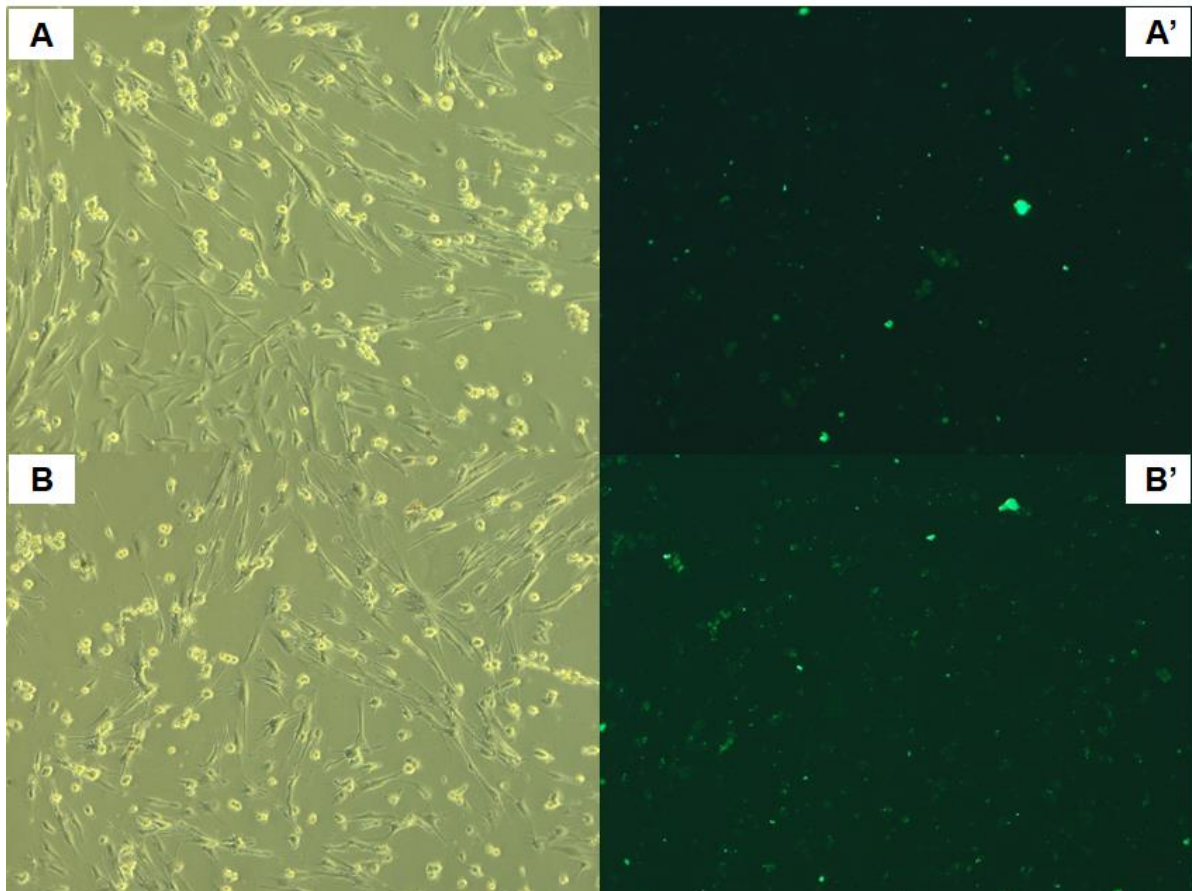
Quanto à concentração de PEI-FITC utilizada, foi possível observar que quanto maior a concentração maior a internalização da PEI/FITC (Figura 1B). Os FFS tratados com as concentrações de PEI/FITC de 80 e $40\mu\text{g/mL}$ não diferiram entre si ($p= 0,8388$) e apresentaram maiores taxas de internalização da PEI/FITC ($95,61\% \pm 1,74$ e $92,06\% \pm 1,74$ respectivamente). Enquanto as concentrações de 0,625 e $1,25\mu\text{g/mL}$ promoveram menores taxas de internalização ($2,22\% \pm 1,74$ e $3,62\% \pm 1,74$ respectivamente) e da mesma forma não diferindo entre si ($p=0,9991$). As demais concentrações 2,5; 5; 10 e $20\mu\text{g/mL}$ diferiram entre si e de todas as outras concentrações e apresentaram taxas crescentes de internalização de PEI-FITC ($15,27\% \pm 1,74$; $45,09\% \pm 1,74$; $72,5\% \pm 1,74$; $85,16\% \pm 1,74$; respectivamente).

Figura 1 - Médias das porcentagens de células que internalizaram a PEI/FITC quando submetidas a diferentes tempos de incubação (A) e diferentes concentrações de PEI-FITC (B). Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 2 - Fibroblastos fetais suínos incubados com PEI-FITC por 0,5h. Fibroblastos incubados com 10 μ g/mL de PEI-FITC em luz branca (A) e luz ultravioleta (A'). Fibroblastos incubados com 40 μ g/mL de PEI-FITC em branca (B) e luz ultravioleta (B').

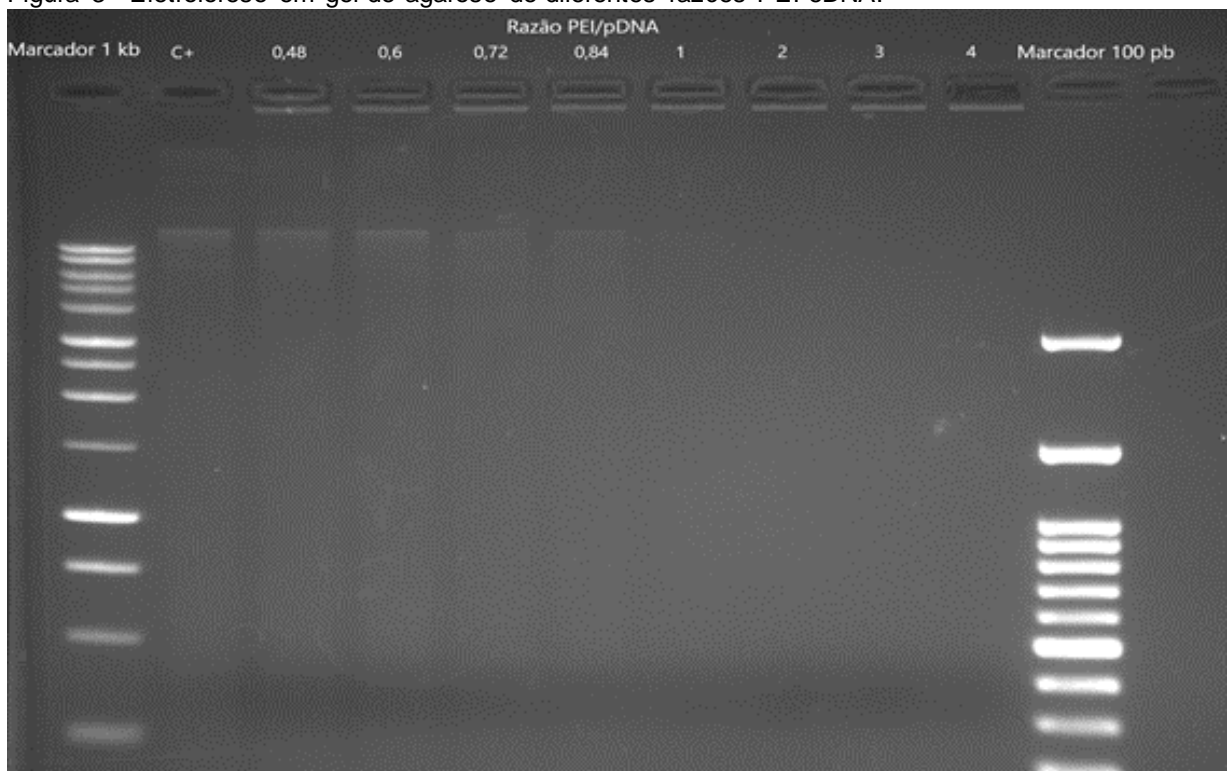


Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.4.2 Experimento 2: Eletroforese em gel de agarose

A capacidade de ligação entre a PEI e o eDNA foi analisada qualitativamente através eletroforese em gel de agarose (Figura 3). A primeira e a última coluna correspondem ao marcador molecular de DNA, e a coluna 2 refere-se ao controle negativo, onde apenas eDNA está presente (N/P = 0,0). As colunas correspondentes ao N/P 0,48 ao 0,84 evidenciam que ainda existem cargas negativas provenientes dos grupos fosfatos presentes no DNA, sendo o polímero, nestas concentrações, incapaz de neutralizar completamente as cargas, permitindo o deslocamento do DNA através do gel. É possível notar que conforme a razão N/P aumenta, o deslocamento do eDNA no gel diminui, e a partir da razão N/P de 1 os poliplexos permaneceram estáticos sob o campo elétrico, sugerindo partículas neutras ou positivas.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose de diferentes razões PEI-eDNA.



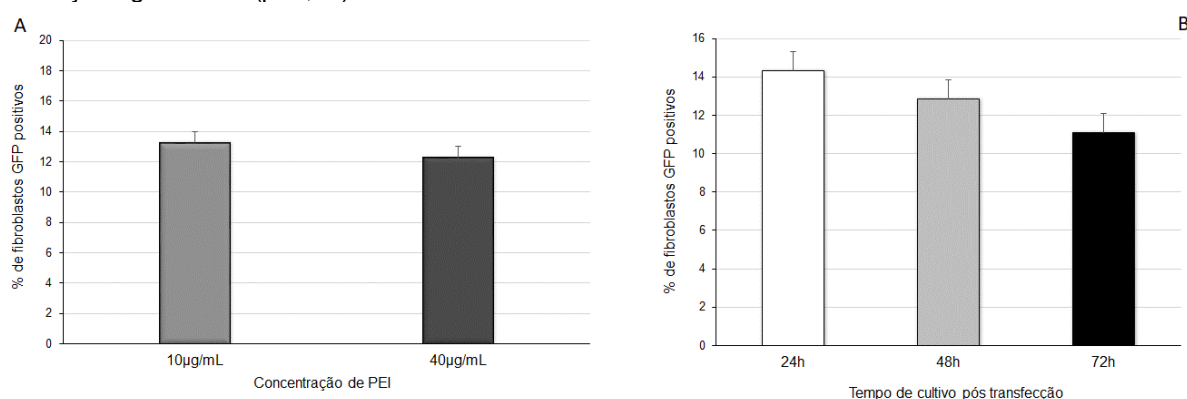
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.4.3 Experimento 3: Transfecção de fibroblastos fetais suínos

4.4.3.1 Avaliação da expressão da GFP

Não houve interação entre a concentração de PEI utilizada na preparação do poliplexo (10 e 40µg/mL) e o período de avaliação pós transfecção ($p=0,4413$) na percentagem de células que expressaram proteína verde fluorescente. A percentagem de fibroblastos que expressaram GFP não foi afetada pela concentração de PEI ($p=0,3552$), nem pelo período de avaliação ($p=0,0543$). A transfecção utilizando os poliplexos 1 (10µg/mL) e 2 (40µg/mL) proporcionaram taxas de expressão semelhantes da proteína fluorescente ($13,23\% \pm 0,73$ e $12,26\% \pm 0,73$) respectivamente ($p=0,9722$), (Figura 4A). A percentagem de FFS que expressaram GFP foi semelhante ao longo de 3 dias de avaliação. Após 24h de transfecção, $14,32\% \pm 0,89$ dos FFS expressavam GFP, após 48h da transfecção, $12,23\% \pm 0,89$ e ao final de 72h da transfecção $11,10\% \pm 0,89$ dos FFS expressaram proteínas verde fluorescente (Figura 4B). A análise da expressão de GFP através de citometria de fluxo está demonstrada na figura 6A (linha superior).

Figura 4 - Médias das percentagens de fibroblastos fetais suínos que expressaram proteína verde fluorescente após incubação com os poliplexos. A: Expressão de GFP de acordo com a concentração de PEI no poliplexo. B: Expressão de GFP ao longo do tempo. Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das percentagens \pm EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).

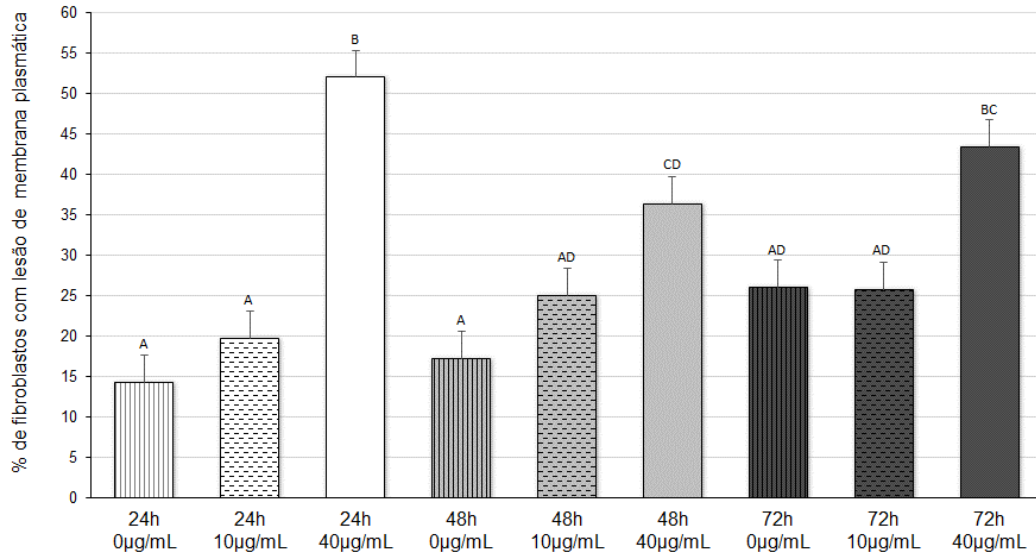


Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.4.3.2 Avaliação da integridade de membrana citoplasmática

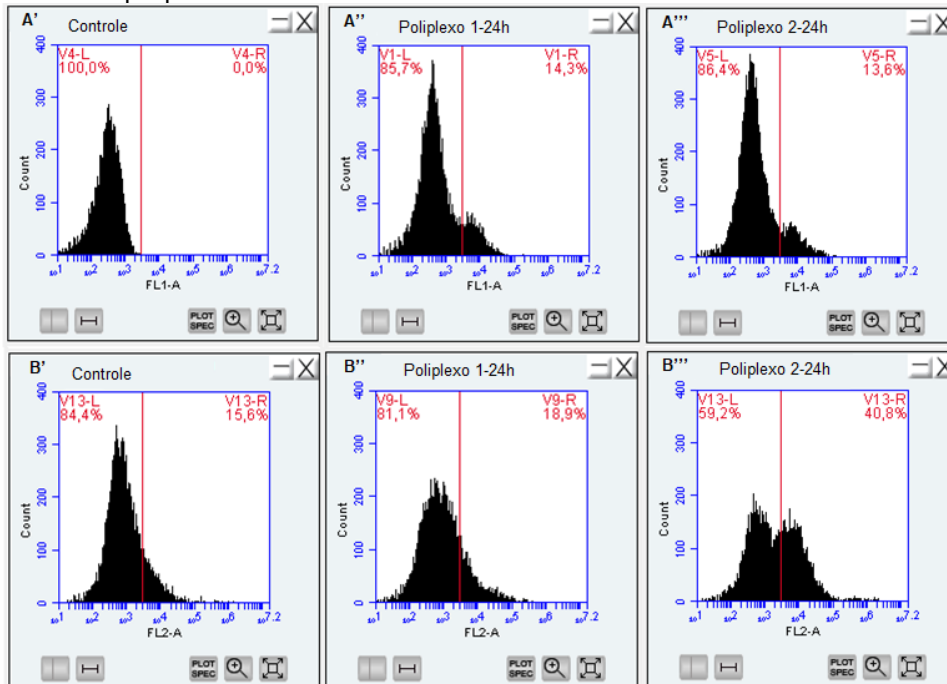
Foi verificada interação ($p=0,0074$) entre a concentração de PEI utilizada na preparação do poliplexo e os períodos de avaliação pós transfecção. Os fibroblastos transfectados apresentaram diferentes taxas de lesão de membrana plasmática, que variou de acordo com a concentração da PEI no poliplexo (10 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o período de avaliação pós transfecção. A porcentagem de fibroblastos com lesão de membrana encontrados no período de 24 horas para os grupos 0, 10 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi de 14,3% \pm 3,36 e 19,8% \pm 3,36 e 52,0% \pm 3,36 respectivamente (Figura 5). Como é possível observar às 24 horas a concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diferiu do controle ($p<0,0001$) e da concentração 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p= 0,0002$). Às 48 horas, a concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diferiu apenas do 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p=0,0043$). Sendo que porcentagem de fibroblastos com lesão de membrana neste período para o grupo 0, 10 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi de 17,23% \pm 3,36 e 25,05% \pm 3,36 36,38% \pm 3,36 respectivamente. Na avaliação de 72 horas após a transfecção, a concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diferiu do 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p<0,0141$) e da concentração 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p= 0,0118$). Neste período a porcentagem de fibroblastos com lesão de membrana do grupo 0, 10 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi de 26,06% \pm 3,36 e 25,78% \pm 3,36 e 43,43% \pm 3,36 respectivamente. As concentrações de PEI de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as 24 e 72 horas não diferiram entre si ($p= 0,6798$) e apresentaram a maior porcentagem de fibroblastos com lesão de membrana. A análise da integridade de membrana plasmática através de citometria de fluxo está demonstrada na figura 6B (linha inferior).

Figura 5 - Médias das porcentagens de fibroblastos fetais suínos com lesão de membrana citoplasmática transfectados com diferentes concentrações de PEI ao longo do tempo. Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 6 - Avaliação da expressão de GFP (avaliados no canal FL-1, linha superior) e integridade de membrana plasmática (canal FL-2, linha inferior) dos FFS após 24 horas da transfecção, realizada através de citometria de fluxo. **A'** e **B'**: Grupo controle (sem incubação com poliplexos). **A''** e **B''**: Fibroblastos fetais suínos transfectados com o poliplexos 1. **A'''** e **B'''**: Fibroblastos fetais suínos transfectados com o poliplexos 2.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.5 DISCUSSÃO

Utilizando a estratégia proposta por Saito e Saitoh (2012), foi possível verificar que a internalização da PEI-FITC não sofreu efeito do tempo de incubação. Os resultados sugerem que o período 0,5h de incubação do polímero com as células foi suficiente para a entrada da PEI. Esse resultado está de acordo com outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Souza et al. (2018) ao também avaliarem fibroblastos fetais suínos incubados com PEI-FITC por 3 horas e 6 horas não observaram diferenças na taxa de internalização. Da Silva et al. (2018) avaliando a PEI-FITC em espermatozoides suínos, observou que 10 minutos e 2 horas de incubação não diferiu nas taxas de internalização. Neste sentido, avaliando diferentes tipos celulares não encontramos evidências do efeito do tempo de incubação na internalização da PEI. A maioria dos trabalhos utilizam um período de transfecção que varia entre 2-6 horas (FORCARTO, 2017; HSU e ULUDAG, 2012), no entanto, os estudos com polietilenoimina não abordam o efeito do tempo, e também não o justificam, o que dificulta a comparação de resultados. Ao avaliarem o mecanismo de endocitose em fibroblastos de camundongo (linhagem L929), Remy-Kristensen et al. (2001) demonstraram que os poliplexos foram absorvidos eficientemente em menos de 10 minutos em endossomos que não excederam 200 nm de diâmetro. Em outro estudo com linhagem EA.hy926, foi demonstrado que 30 minutos após a transfecção os complexos PEI/eDNA começaram a se ligar às superfícies celulares e formar agregados (GODBEY, WU, MIKOS, 1999). Neste trabalho demonstramos que com 30 minutos de incubação a PEI já se encontrava no citoplasma de fibroblastos fetais suínos. Desta forma, para as concentrações de PEI, como as utilizadas neste estudo, deve-se reconsiderar o tempo de incubação PEI-eDNA. Possivelmente em muitos trabalhos o tempo de incubação utilizado não era necessário para transfecção e ainda, o excesso de tempo pode estar prejudicando as células, visto que a citotoxicidade é um dos fatores que mais limita a transfecção, e que pode ser afetada pelo tempo de exposição das células a PEI/eDNA. Nas condições estudadas, foi demonstrado que para fibroblastos fetais suínos o tempo de incubação pode ser reduzido sem prejuízo à endocitose, porém, os demais parâmetros devem ser considerados para uma eficiente transfecção.

Ao contrário do tempo, a internalização da PEI-FITC, sofreu efeito da concentração. Embora todas as concentrações de PEI-FITC terem sido

internalizadas em FFS, observamos que a porcentagem de células marcadas com FITC aumentou proporcionalmente junto com a concentração de PEI, isto é, quanto maior a concentração de PEI, maior o número de células marcadas FITC. Silva et al. (2018) avaliando diferentes concentrações de PEI marcada com FITC em espermatozoides suínos, não observou diferença na porcentagem de espermatozoides que internalizaram PEI-FITC. Porém, o autor usou altas concentrações de PEI marcada (0,5, 1, 2 e 4 mg/mL), provavelmente a menor concentração foi suficiente para que grande parte dos espermatozoides conseguissem internalizar a PEI. Neste estudo os resultados mostraram que somente a partir da concentração de 10µg/mL de PEI foi possível atingir um grande número de FFS marcados (72,5%). Já as concentrações de 40µg/mL e 80µg/mL proporcionaram porcentagem de FFS marcados com PEI-FITC similares, onde ambas atingiram mais de 90% da população de FFS, o que sugere que nas condições estudadas a concentração 40µg/mL de PEI já é suficiente para atingir o máximo de FFS marcados. Pelo exposto acima, foram utilizadas as concentrações de 10 e 40µg/mL para transfectar os FFS. Embora os FFS possam ser facilmente obtidos e cultivados, a possibilidade de transfectar o máximo de células de uma só vez impactaria de forma positiva no estabelecimento de linhagens transgênicas, uma vez que, a triagem e seleção da população de células transgênicas, é um processo trabalhoso.

A complexação de polímero/eDNA é conhecida como pré-requisito para a internalização celular e uma transfecção eficiente, uma vez que, a estabilidade dos poliplexos desempenha um papel importante na proteção do eDNA contra a degradação por nucleases no meio intracelular (TIAN et al. 2007). Neste sentido a eletroforese é uma importante ferramenta na avaliação da estabilidade do poliplexo, e pode ser usada como um guia para estabelecer as condições de preparação e os estudos de transfecção (SEMENSATO, 2014). Neste estudo verificou-se que a medida que a razão N/P aumenta, a mobilidade do poliplexos diminuiu, e a partir da razão N/P igual 1 os poliplexos demonstraram estar complexados e estáveis, já que não foi mais observado mobilidade do poliplexo no gel. Em geral, a maioria dos estudos com PEI utilizam razões N/P igual ou superior a 6, pois acredita-se que para uma transfecção ideal, os poliplexos de PEI devem ser preparados de forma que aproximadamente 86% do polímero permanece livre e não ligado ao eDNA. Porém, o excesso de polímero deve ser evitado já que a fração livre não complexada pode

prejudicar a função da membrana citoplasmática (FISCHER et al., 1999) e levar a apoptose (MOGHIMI, et al., 2005). Por esse motivo, foi escolhido a razão PEI/eDNA igual a 2 para realizar as transfecções, afim de garantir que todo eDNA estivesse complexo, mas ainda houvesse PEI livre para tornar poliplexos mais propenso à internalização celular via endocitose. Os estudos preliminares realizados para otimização da concentração, tempo e razão N/P, levaram a produção de dois poliplexos onde foram utilizadas as concentrações de PEI de 10µg/mL e 40µg/mL, o tempo de incubação de 0,5h e a razão N/P igual a 2. Assim, os FFS foram transfectados utilizando estes dois poliplexos, e a expressão da GFP e integridade de membrana plasmática foi avaliada ao longo de três dias.

Ambos os poliplexos foram capazes de transfectar os fibroblastos fetais, aproximadamente 12% dos fibroblastos expressaram a proteína verde fluorescente. Diferentes taxas de expressão de GFP são relatadas utilizando protocolos com PEI, mas normalmente a maior parte da expressão é transiente, isto é, são observados queda gradual na porcentagem de células que expressaram o GFP, certamente pela não integração do gene de interesse ao material genético da célula hospedeira. Nesse sentido um fato interessante foi observado em nosso estudo, a porcentagem de fibroblasto positivos para GFP, não diferiu ao longo dos três dias de avaliação pós transfecção. Esses resultados sugerem que o plasmídeo atingiu o núcleo dos fibroblastos e o gene GFP foi transcrito e traduzido na proteína verde fluorescente e possivelmente integrado ao genoma. Coonrod e Horwitz (1997) observaram que a integridade do DNA que chega ao núcleo parece ser determinante para a eficiência de transferência gênica. De fato, a degradação dos ácidos nucleicos por nucleases citoplasmáticas durante a internalização celular ou trânsito até o núcleo, bem como a fusão de endossomos contendo o DNA exógeno com os lisossomos é determinante para o sucesso da transfecção (WATTIAUX et al., 2000; SANZ et al., 2011). Nesse aspecto, o efeito “esponja de elétrons” proposto para PEI poderia constituir uma vantagem, visto que o eDNA recebe proteção adicional contra a degradação.

Outra possível explicação para a estabilidade da transfecção pode estar relacionada a natureza do plasmídeo. O plasmídeo utilizado foi o vetor com integração baseada no transposon PiggyBac. Os transposons são elementos genéticos móveis que agem através de mecanismo de transposição do tipo “corta e cola” através da enzima transposase. As transposases reconhecem e se ligam aos transposons flaqueadores de elementos de repetição invertidos, cortam esse

segmento de DNA do doador e o reinserem no genoma receptor. Essas propriedades provaram ser uma ferramenta inestimável para entrega de genes em aplicações como transgênese, mutagênese para pesquisa de câncer ou terapia gênica. Marh et al (2012), demonstrou uma eficiência cinco vezes maior na produção de camundongos transgênicos ao realizar a microinjeção pronuclear utilizando o vetor piggyBac. Neste sentido, o mecanismo de escape lisossomal da PEI combinado com a natureza do plasmídeo pode estar relacionado na estabilidade da expressão de GFP mostrada neste trabalho.

O tipo celular é um fator relevante e para a eficiência da transfecção. Neste estudo foi utilizado fibroblastos fetais suínos de um banco de células criopreservadas em 3ª passagem. Estudos anteriores observaram que culturas primárias de fibroblastos humanos são difíceis de serem transfectados (BAUM et al., 1994; VEELKEN et al. 1994; JORDAN et al., 2008), enquanto células imortalizadas HeLa são facilmente transfectadas e com alta eficiência. No trabalho realizado por Dang et al. (2011), transfectando-se células de ovário de hamster (CHO), células embrionárias de rim humano (HEK293T) e fibroblastos de rim de macaco (COS) com PEI, observaram-se eficiências que variaram de aproximadamente 20% a quase 40%, sendo que a célula que melhor respondeu à transfecção foi a HEK293T. É possível perceber que a eficiência da transfecção pode variar grandemente de acordo com o tipo celular utilizado.

Outro aspecto com grande influência sobre a eficiência da transfecção e que foi otimizado neste trabalho, é a razão N/P. Nos poliplexos desenvolvidos para transfecção foi utilizando a mesma razão N/P igual a 2. É interessante destacar que mesmo utilizando concentrações de PEI bem diferentes (10 e 40µg/mL) obtivemos porcentagens de expressam de GFP semelhantes. E esse resultado pode estar relacionado ao fato que ambas as concentrações foram combinadas com a mesma razão N/P. Forcato et al. (2017), constataram que a eficiência da transfecção foi afetada principalmente pela razão polímero/eDNA, seguida concentração de DNA e peso molecular da PEI. Os mesmos autores obtiveram 38,4% de expressão de GFP em fibroblastos bovinos utilizando a mesma razão N/P igual a 2. Entretanto, outro estudo também com fibroblasto bovino obteve apenas 2,66% de expressão de GFP utilizando a razão N/P igual a 6 (ARAÚJO; PEREIRA; CAMARGO, 2014).

Diferente da expressão de GFP, a porcentagem de FFS com lesão de membrana sofreu influência da concentração de PEI. Observou-se que a

concentração de 10µg/mL não causou lesão de membrana significativa nas células em nenhum dos períodos avaliados pós transfecção. Por outro lado, a concentração de 40µg/mL levou uma alta taxa de lesão de membrana especialmente às 24 e 72 horas pós transfecção. Fisher et al., (1999) sugeriram que os complexos PEI/eDNA formam agregados na superfície de membrana plasmática desestabilizando-a, o que resulta na ruptura. Avaliando os níveis de toxicidade da PEI 25kDa, em fibroblastos fetais bovinos, Forcato et al. (2012) verificaram que, quando as células foram transfectadas com 2ug a 4ug/mL de PEI, os índices de células viáveis foram significativamente diferentes (54,7% e 18,5%, respectivamente), enquanto que 1ug/mL manteve a viabilidade celular em torno de 90% sem diferença estatística para eficiência de transfecção. Utilizado uma concentração 10 vezes superior ao autor (10µg/mL) não foi observado lesão de membrana plasmática, o que sugere que fibroblastos suínos podem ser mais tolerantes a toxicidade causada pela PEI.

Estudos sugerem que a PEI apresenta dois tipos de citotoxicidade, uma imediata que está correlacionada com a lesão de membrana, e outra retardada, que está relacionada a descomplexação da PEI dentro da célula. A PEI dissociada pode interagir com vários componentes celulares com cargas negativas. Essa interação pode prejudicar suas funções celulares normais e induzir a apoptose. Esses estudos sugeriram que a citotoxicidade do complexo PEI/eDNA pode ser estreitamente relacionados ao nível de expressão gênica (GODBEY, WU, MIKOS, 1999; LEE, 2007). No presente estudo não foi observado esse efeito, pois apenas a concentração de 40µg/mL demonstrou ser citotóxica para as células, e está apresentou a mesma porcentagem de células GFP positivas que a concentração de 10µg/mL, sendo que essa porcentagem não diferiram ao longo do tempo. Estudos demonstram que a citotoxicidade está relacionada a inúmeros fatores, como, tipo de célula, peso molecular, grau de ramificação e concentração do polímero, bem como, tempo de incubação (MOGHIMI, *et al.*, 2005; LEE, *et al.*, 2007; KAFIL, 2011; OKON, *et al.*, 2014).

4.6 REFERÊNCIAS

ANDREASON, G. L.; EVANS, G. A. Optimization of electroporation for transfection of mammalian cell lines. **Analytical Biochemistry**, v. 180, p. 269-275, 1989.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2817356>. Acesso em 18 dez. 2018.

ARAT, S. *et al.* In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype.

Biololy of Reproduction, v. 66, p. 1768–1774, jun. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021060>. Acesso em: 11 jan. 2019.

BAUM, C. *et al.* An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. **Bio.Techniques**, v. 17, p. 1058-1060, dez. 1994. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7873174>. Acesso em: 25 nov. 2018.

BRESSAN, F. F. **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008. Disponível em:

https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-30072008-090317/publico/Fabiana_Fernandes_Bressan.pdf. Acesso em: 23 jan. 2019.

CAMPBELL, K. H. *et al.* Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68, p. S214-S23, set. 2007. Supl. 1. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17610946>. Acesso em: 11 jan. 2019.

COONROD, A.; LI, F. Q.; HORWITZ, M. On the mechanism of DNA transfection: eficiente gene transfer without viruses. **Gene Ther.**, v. 4, n. 12, p. 1313-1321, dez. 1997. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472555>. Acesso em: 15 out. 2019.

DANG, S. P. *et al.* A novel transfection method for eukariotic cells using polyethilenimine coated albumin microbubbles. **Plasmid**, v. 66, p. 19-25, out. 2011.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21426917>. Acesso em: 15 out. 2018.

FELGNER P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.84, p.7413-7417, nov.1987. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2823261>. Acesso em: 03 nov. 2018

FISCHER, D. *et al.* A novel nonviral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. **Pharm. Res.**, v. 16, n. 8. p. 1273–1279, ago. 1999.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1014861900478>. Acesso em: 29 out. 2018.

FORCATO, D. O. *et al.* Optimization of branched 25kDa polyethylenimine for efficient gene delivery in bovine fetal fibroblasts. **Reproduction, Fertility and Development**,

v. 25, n. 1, p.313-313, 2012. Disponível em:

<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/22782>. Acesso em: 12 dez. 2018.

FORCATO, D. O. et al. Transfection of bovine fetal fibroblast with polyethylenimine (PEI) nanoparticles: effect of particle size and presence of fetal bovine serum on transgene delivery and cytotoxicity. **Cytotechnology**. V.69, p655–665, ago. 2017.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5507845/>. Acesso em: 12 dez. 2018.

GAO, X.; KIM, K.S.; LIU, D. Nonviral gene Delivery: What we know and what is next. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 92-104, mar. 2007. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408239>. Acesso em 17 jan. 2019.

GODBEY, W. T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.96, p.5177-5181, abril.1999. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220439>. Acesso em: 20 dez. 2018.

HEYMAN, Y. et al. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses From Cattle Cloned Embryos. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 6-13, jan. 2002. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751257>. Acesso em: 12 jan. 2019.

HSU, C. Y. M.; ULUDAĞ, H. A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. **Nature protocols**, v. 7, n. 5, p. 935–45, abr. 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517260>. Acesso em: 19 dez. 2018.

JORDAN, E. T. et al. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. **J. Biomol. Tech.**, v. 19, n. 5, p. 328-334, dez. 2008.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2628074/>. Acesso em: 30 set. 2018.

KAFIL, V., OMIDI, Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in a431 cells. **Bioimpacts**. v.1, p.23-30, jun. 2011. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678404>. Acesso em: 20 nov. 2018.

KUHHOLZER, B. et al. Clonal Lines of Transgenic Fibroblast Cells Derived from the Same Fetus Result in Different Development When Used for Nuclear Transfer in Pigs. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1695–1698, jun. 2001. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369597>. Acesso em: 12 jan. 2019.

LEE, G. S. et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. **Theriogenology**, v. 59, p. 1949–1957, maio 2003. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600732>. Acesso em: 24 jan. 2019.

LEE, M. Apoptosis Induced by Polyethylenimine/DNA Complex in Polymer Mediated Gene Delivery. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 28, n. 1. Nov. 2007. Disponível em:

http://journal.kcsnet.or.kr/main/j_search/j_download.htm?code=B070116. Acesso em: 13 dez. 2018.

LUNGWITZ, U.; BREUNIG, M.; BLUNK, T.; GO'PFERICH A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60 p. 247–266, jul. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939236>. Acesso em: 25 nov. 2018.

MARH, J. et al. Hyperactive self-inactivating piggyBac for transposase-enhanced pronuclear microinjection transgenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.20, p.19184-19189, nov. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093669>. Acesso em: 20 nov. 2018.

MOGHIMI S. M. *et al.* A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. **Mol Ther**, v. 11, p. 990–995, jun. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922971>. Acesso em: 15 nov. 2018.

MUENTHAISONG, S.; DINNYES, A.; NEDAMBALE, T.L. Review of somatic cell nuclear transfer in pig. **Afri J Biotechnol**, v. 10, n. 76, p. 17384-17390, nov. 2011. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/97867/87165>. Acesso em: 10 jan. 2019.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414-421, 2010. Supl. Especial. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v39sspe/46.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2019.

OKON, E. U. *et al.* *In-vitro* cytotoxicity of Polyethyleneimine on HeLa and Vero Cells. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 5, n. 3, p. 192-199, mar.2014. Disponível em: https://www.staffs.ac.uk/assets/In-vitro%20cytotoxicity%20of%20Polyethyleneimine%20on%20HeLa%20and%20Vero%20Cells_tcm44-87412.pdf. Acesso em: 16 dez. 2018.

PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-Scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Molecular Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 225-237, out. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172668>. Acesso em: 24 jan. 2019.

POWELL, A. M. *et al.* Cell Donor Influences Success of Producing Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 210-216, jul. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998911>. Acesso em: 11 jan. 2019.

RÉMY-KRISTENSEN, A. *et al.* Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1514, p. 21-32, set. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273601003595>. Acesso em: 16 nov. 2018.

SAITO, M.; SAITOH H. Labeling of polyethylenimine with fluorescent dye to image nucleus, nucleolus, and chromosomes in digitonin-permeabilized hela cells. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*, v. 9, n. 76, p. 1777–1780, set. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972325>. Acesso em: 18 jan. 2019.

SANZ, V. *et al.* Protamine and chloroquine enhance gene delivery and expression mediated by RNA-wrapped single walled carbon nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 12, n.3, p.1739-1747, mar. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754975>. Acesso em: 21 nov. 2018.

SEMENSATO, J. **Derivados de poli(L-Lisina) com fosforilcolina para transferência gênica não-viral**. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNSP_7b133f8664a243edc079f9cb6a87ac3a. Acesso em: 18 nov. 2018.

SHARMA, A. *et al.* Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, v. 7, n. 4, p. 505-13, ago. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272669>. Acesso em: 15 nov. 2018

SILVA, Z. da. *et al.* Comparison between electroporation and polyfection in pig sperm: efficiency and cell viability implications. *Zygote*, v. 26, p. 286-293, ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30210017>. Acesso em: 15 dez. 2018.

SOUZA, A. P. *et al.* Otimização da concentração e tempo de incubação da polietilenoimina como agente transfectante em fibroblastos suínos. *In: XII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (JINC)*, 2018, Concórdia. **Anais eletrônicos** [...]. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2018, p. 115-117. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190417/1/final8963.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2019.

TIAN, H. *et al.* Gene transfection of hyperbranched PEI grafted by hydrophobic amino acid segment PBLG. *Biomaterials*, v.28, p.2899–2907, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207001792>. Acesso em: 10 dez. 2018.

VEELKEN, H. *et al.* Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, v. 5, p. 1203-1210, out. 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7849093>. Acesso em: 19 out. 2018.

WATTIAUX, R. *et al.* Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 41, n. 2, p. 201-208, mar. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X99000666>. Acesso em: 10 nov. 2018.

5 CAPÍTULO 2: TRANFEÇÃO GÊNICA EM OÓCITOS E EMBRIÕES SUÍNOS MEDIADA POR POLIETILENOIMINA

RESUMO

Oócitos e embriões são excelentes candidatos para produção de suínos transgênicos devido a sua fisiologia, que favorece a incorporação do DNA, porém, a presença da zona pelúcida e maior sensibilidade desta espécie a agentes estressores, torna a transfecção um desafio. A metodologia de OGM que utiliza oócitos e zigotos na transfecção é a microinjeção, contudo, esta metodologia apresenta baixas taxas de transfecção, além de ser laboriosa e exigir equipamentos especializados. O desenvolvimento de métodos alternativos que superem as limitações de utilização destas células, é de suma importância para o aprimoramento da produção de transgênicos. Os polímeros catiônicos como a polietilenoimina (PEI) se destacam como uma alternativa para entrega segura e eficiente de genes, devido à sua boa biocompatibilidade, versatilidade e tamanho controlável de moléculas, além disso, são baratos e simples de preparar. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do polímero catiônico polietilenoimina como vetor de eDNA visando desenvolver um protocolo para transfecção de oócitos e embriões suínos. Foram realizados 2 experimentos com objetivo de otimizar a concentração de PEI para oócitos e embriões suínos. No experimento 1 foi avaliada a capacidade da PEI de ser internalizadas diferentes concentrações (10, 20; 40 e 80µg/mL) por um período de incubação de 0,5h. Para isso, a PEI foi conjugada com o fluoróforo FITC e incubada tanto nos oócitos quanto nos embriões. No experimento 2, os oócitos e embriões foram transfectados utilizando as concentrações que proporcionaram maiores taxas de internalização combinadas com a razão N/P e o tempo de incubação otimizados no artigo 1. A transfecção foi realizada utilizando-se duas preparações de poliplexo. O poliplexo 1 foi preparado utilizando 20µg/mL de PEI e o poliplexo 2 na concentração de 80µg/mL de PEI, ambos combinados da razão de N/P igual a 2, por um período de incubação de 0,5h. Foram avaliados o desenvolvimento embrionário e a expressão de GFP dos blastocistos produzidos. Não foi verificado efeito da concentração de PEI (20µg/mL e 80µg/mL) no desenvolvimento embrionário. Foi demonstrado que apenas poliplexo 1 (20µg/mL) foi capaz de produzir blastocistos transgênicos para GFP tanto nos oócitos quanto nos embriões. Conclui-se que o protocolo de transfecção constituído por PEI na concentração de 20µg/mL, combinado com a razão N/P de 2, com incubação de 0,5 horas, foi capaz de ultrapassar a zona pelúcida, transfectar oócitos maturados *in vitro* e embriões produzidos *in vivo* e gerar blastocistos transgênicos para GFP sem prejudicar o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Polímero catiônico. Vetores não virais. Transgenia.

5.1 INTRODUÇÃO

Oócitos e embriões são excelentes candidatos para produção de suínos transgênicos, devido a sua fisiologia, que favorecem a incorporação do DNA. Oócitos são células germinativas femininas produzidas no ovário durante a oogenese. A maturação nuclear dos oócitos de mamíferos envolve a ruptura do envelope nuclear e a sequência de etapas que completam a meiose I (MI) até ocorrer a extrusão do 1º corpúsculo polar, atingindo a fase de Metáfase II (MII) (OTERO, 2008). A ausência do envelope nuclear, pode facilitar o contato do DNA com a cromatina, permitindo uma maior eficiência na integração do gene no genoma. Porém, nas metodologias atuais de produção de AGM os oócitos são pouco explorados, na maioria delas, eles são utilizados apenas como receptores, como é caso na transferência nuclear de células somáticas (TNCS) modificadas. Os embriões apresentam alta taxa de divisão celular, e assim como oócitos podem ser excelentes candidatos para a transfecção. Contudo, a transfecção de oócitos e embriões é um desafio principalmente devido a presença da zona pelúcida e da grande sensibilidade desta espécie a agentes estressores. A metodologia de OGM que utiliza oócitos e zigotos na transfecção é a microinjeção. Porém essa técnica é pouco eficiente, difícil de ser executada e o número de células que podem ser transfectadas é limitado (KUES; NIEMANN, 2004). Outra alternativa tem sido o uso de carreadores virais (HOFMANN et al., 2003), mas além dos potenciais efeitos adversos conhecidos, a necessidade de remoção da zona pelúcida, pode prejudicar o desenvolvimento embrionário (RIBAS et al., 2006). Em vetores a base de lipídeos catiônicos a zona pelúcida também mostrou agir como uma barreira na transfecção de embriões (CARBALLADA; RELLOSO; ESPONDA, 2002). Assim o desenvolvimento de métodos alternativos e eficientes de transfecção gênica, que superem as limitações para oócitos e embriões, pode ser uma alternativa mais barata e eficiente, além de menos laboriosa de produção de suínos transgênicos.

Tem-se descrito o uso do polissomo polietilenoimina (PEI) como um bom agente transfectante numa ampla gama de tipos celulares (YAMANO; DAI; MOURSİ, 2010). A PEI é um polímero catiônico, que condensa o eDNA em partículas carregadas positivamente, formando complexos que se ligam à resíduos de superfície aniônicos e são levados para dentro da célula por endocitose (GAO; KIM; LIU, 2007). Desta forma, podem oferecer uma opção mais acessível e segura para

transfecção celular, devido à sua boa biocompatibilidade, versatilidade e tamanho controlável de moléculas, além disso, são baratos e simples de preparar (LUNGWITZ, 2005). No entanto, até o momento, apesar de sua promissora utilização, não há um protocolo padronizado para este polímero visando a transfecção de oócitos e embriões na espécie suína. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do polímero catiônico polietilenoimina como vetor de eDNA visando desenvolver um protocolo para transfecção de oócitos e embriões suínos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Colheita dos oócitos para maturação *in vitro*

Os ovários foram obtidos em abatedouro localizado na cidade de Chapecó, SC. Após a colheita, os ovários foram imediatamente lavados em solução fisiológica (0,9% NaCl) e transportados em recipiente térmico à temperatura entre 30-32°C para o laboratório. No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70% e novamente lavados em solução fisiológica aquecida a 36°C.

Para recuperação dos complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados folículos de 2-5 mm de diâmetro, com auxílio de agulha 18 G acoplada em seringa de 5 mL. O material aspirado foi depositado em tubos cônicos de 50mL e após um período de 10 minutos, para a sedimentação dos oócitos, o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta sorológica de 25 mL e o sedimento foi filtrado em filtro celular, para remoção de partículas pequenas que atrapalham a recuperação dos oócitos. O filtro foi lavado e o sedimento ressuspendido em meio lavagem, composto TCM199 suplementado 10% de SFB, 4mg/mL de BSA e 50 UI/mL de gentamicina; e distribuído em placas de Petri descartáveis de 100 mm. Os oócitos foram localizados em esteromicroscópio e transferidos para placas de Petri de 35mm contendo 2mL de meio de lavagem, sendo então selecionados e avaliados morfológicamente, quanto à homogeneidade do citoplasma (granulações finas e homogêneas) e conformação das células do cumulus (mínimo de três camadas de células do cumulus compactas e completas). Oócitos que possuíam estas características foram submetidos à maturação.

5.2.2 Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram submetidos à MIV em placas de cultivo celular de 4 poços (NUNC®, Denmark) contendo 400µL de meio de maturação, em grupos de 40-50 CCOs por poço. Durante as primeiras 22 horas a maturação foi realizada em meio composto TCM199 suplementado com 3,05mM de glicose; 0,91mM de piruvato de sódio; 50UI/mL de gentamicina; 0,57mM cisteína; 10% de fluido folicular suíno (PFF), 10ng EGF/mL e 10UI hCG/mL e 10UI eCG/mL. Ao final deste período os CCOs foram transferidos para o mesmo meio de maturação desprovido de hormônios (hCG e eCG), onde permaneceram por mais 22 horas. Os oócitos foram maturados em estufa a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar e alta umidade.

5.2.3 Fecundação *in vitro*

A fração rica do sêmen foi colhida pelo método da mão enluvada. Após a colheita, o sêmen foi diluído em diluidor comercial na concentração de 35x10⁶ espermatozoides/mL e armazenado entre 15 e 18°C por 24 horas. No dia da FIV, 1mL de sêmen foi centrifugado por 800xg por 3 minutos. Após a centrifugação, o sedimento foi removido e centrifugado (800xg por 3 minutos) em 1mL meio de fecundação Porcine fertilization medium (PFM - Cosmo Bio). Ao final da centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 1mL de PFM. Para a inseminação, foram determinadas a motilidade (microscopia optica) e a concentração espermática (câmara de Neubauer). Em seguida, 5x10⁵ espermatozoides/mL foram incubados com os oócitos que tiveram as células do cumulus previamente removida por ação mecânica, em microgotas de 100µL de PFM cobertas com óleo mineral, sendo mantidos em estufa a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Após 30 minutos, os oócitos e espermatozoides aderidos a zona pelúcida foram delicadamente colocados em uma nova microgota de 100µL de PFM, sob óleo mineral. Os oócitos foram mantidos em estufa à 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade por mais 5 horas e meia, totalizando 6 horas.

5.2.4 Cultivo *in vitro*

Para o cultivo, os presumíveis zigotos foram lavados 3 vezes em meio definido Porcine Zygote Medium (PZM5 – Cosmo Bio) suplementado com 4mg/mL de BSA, e 10mg/ml EGF (PZM 5 suplementado) e colocados em microgotas de 100µL deste meio sob óleo mineral para cultivo por 7 dias. No terceiro dia após a fecundação *in vitro*, foram acrescentados à microgota de cultivo 45µL do meio PZM5 suplementado (“feeding” 1). No quinto dia pós fecundação, foram retirados 45µL de meio, e acrescentado novamente 45µL de PZM5 suplementado com 10% de SFB (“feeding” 2). Os embriões foram cultivados em atmosfera contendo 5% de CO₂ em estufa a 38,5°C e alta umidade.

5.2.5 Colheita dos embriões produzidos *in vivo*

Os embriões produzidos *in vivo* foram colhidos de matrizes descartes em abatedouro. Após 6 horas da detecção de cio, as matrizes receberam 50µg/mL de GnRH para estimular o crescimento folicular e ovulação. Foram realizadas duas inseminações com intervalo de 24 horas e 48 horas, após a detecção do cio, respectivamente. Os úteros foram coletados abatedouro aproximadamente 24 horas após a última inseminação.

O trato reprodutivo foi coletado e transportado até o laboratório em recipiente térmico. Os embriões foram coletados por lavagem, conforme ilustrado na Figura 1. Os 15 centímetros dos cornos uterinos proximais aos ovários foram dissecados assim como os ovidutos. A extremidade distal da secção do útero foi obliterada com auxílio de pinça hemostática. Após completa dissecação do oviduto (Figuras 1A e 1B), a entrada do infundíbulo foi localizada (Figura 1C) e nela inserida uma sonda plástica acoplada à seringa de 20mL contendo PBS com 1% de soro fetal bovino para a realização da lavagem (Figura 1D). O conteúdo líquido do oviduto foi massageado em direção ao corno uterino e o oviduto retirado com uma incisão na junção útero-tubárica (Figura 1E). Neste local, foi inserida uma sonda plástica para a realização de nova lavagem (Figura 1F). O corno uterino foi suspenso pela região cranial (Figura 1G) sendo o conteúdo líquido deslocado por massagem em direção caudal e a extremidade cranial obliterada com auxílio de pinça hemostática (Figura 1H). A extremidade distal então foi liberada e inserida em um tudo cônico de

centrifuga de 50mL. O líquido que continha os embriões foi recuperado por gravidade pela suspensão da região cranial do corno uterino (Figura 1I e 1J). O lavado foi colocado em placas de Petri de 100mm e observado em estereomicroscópio para recuperação dos embriões.

Figura 1 - Coleta de embriões suínos. Dissecção do oviduto (Figuras 1A e 1B). Localização da entrada do infundíbulo (Figura 1C). Lavagem do oviduto (Figura 1D). Retirada do oviduto por incisão na junção útero-tubárica (Figura 1E). Inserção da sonda plástica para a realização de nova lavagem (Figura 1F). Suspensão do corno uterino pela região cranial (Figura 1G). Deslocamento do líquido por massagem em direção caudal e a extremidade cranial obliterada com auxílio de pinça hemostática (Figura 1H). Coleta do líquido que continha os embriões por gravidade pela suspensão da região cranial do corno uterino (Figura 1I e 1J).



Fonte: Imagem cedida por Marques, M.G. (arquivo pessoal).

5.2.6 Preparação da PEI

Para realização dos experimentos foi utilizada polietilenoimina ramificada com um peso molecular de 25 kDa (Sigma-Aldrich). A solução estoque de 18mM de

polietilenoimina foi preparado diluindo 16,2mg/mL de PEI em 20mL de PBS com pH ajustado para 7.

5.2.7 Conjugação PEI-FITC

A conjugação da PEI com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi realizada de acordo com Saito e Saitoh (2012). Para isso foram preparadas duas soluções. A primeira solução, de PEI a 20mg/mL em PBS, a qual foi mantida sob refrigeração (4-8°C) por 24 horas. A segunda solução, de FITC diluído em DMSO na concentração de 10mM. As soluções foram misturadas para obtenção da concentração final de 0,1mM de FITC, e mantidas sob agitação por 2,5 horas para completa conjugação. A solução resultante foi dialisada em 1 litro de PBS gelado por 24 horas, para remoção de partículas de FITC não ligadas a PEI.

5.2.8 Experimento 1: Avaliação da internalização de PEI-FITC

A transfecção gênica de oócitos e embriões é limitada pela zona pelúcida, uma camada que protege estas células de agentes exteriores, neste caso eDNA. Desta forma, a PEI-FITC foi utilizada para avaliar a capacidade da PEI em atravessar a zona pelúcida e a membrana plasmática de oócitos e zigotos. Foram avaliadas 4 concentrações de PEI-FITC, 80µg/mL, 40µg/mL, 20µg/mL e 10µg/mL, por 0,5h. Neste estudo, não foi avaliado o tempo de incubação, isto porque, em todos os trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa não foram observados efeito do tempo na internalização da PEI (SOUZA et al., 20017; SILVA, et al., 2018). No estudo anterior (artigo 1), foi demonstrado que o período de incubação de 0,5h foi suficiente para internalização de PEI-FITC em fibroblastos fetais suínos. Desta forma, utilizou-se o mesmo tempo de incubação (0,5h) para realização de todos os experimentos deste capítulo.

5.2.8.1 Oócitos

A PEI-FITC foi avaliada em oócitos maturados conforme item 4.2.2. Ao final da maturação *in vitro*, as células dos cumulus foram removidas, através de

sucessivas pipetagens. Posteriormente os oócitos foram lavados em 3 gotas de meio MIV2 e distribuídos para compor os tratamentos.

- Controle: Oócitos incubados com MIV2 (Sem PEI-FITC) por 0,5h;
- PEI 10: Oócitos incubados com 10µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;
- PEI 20: Oócitos incubados com 20µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;
- PEI 40: Oócitos incubados com 40µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;
- PEI 80: Oócitos incubados com 80µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;

Ao final do período de exposição os oócitos foram lavados em 3 gotas de MIV2 e colocados entre lâmina e lamínula para avaliação da internalização de PEI-FITC em microscópio de fluorescência. A visualização dos oócitos foi realizada através de microscópio de epifluorescência (Axio Observer A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) usando filtro de 470-490 nm. Os oócitos foram fotografados e a porcentagem média de pixels fluorescentes foram analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J 1.40g®. Foram realizadas 4 repetições, sendo observados 25-30 oócitos por grupo.

5.2.8.2 Zigotos

A internalização da PEI-FITC foi avaliada em zigotos produzidos *in vitro* conforme descrito nos itens 5.2.3 e 5.2.4. Aproximadamente 20 horas após a fertilização *in vitro* os presumíveis zigotos foram lavados em PZM suplementado e distribuídos nos tratamentos.

- Controle: Zigotos incubados com PZM5 suplementado (Sem PEI-FITC) por 0,5h;
- PEI 10: Zigotos incubados com 10µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;
- PEI 20: Zigotos incubados com 20µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;
- PEI 40: Zigotos incubados com 40µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;
- PEI 80: Zigotos incubados com 80µg/mL de PEI-FITC por 0,5h;

Ao final do período de exposição presumíveis zigotos foram lavados e 3 gotas PZM5 suplementado e colocados entre lâmina e lamínula para avaliação da

internalização de PEI-FITC em microscópio de fluorescência. A visualização dos zigotos foi realizada através de microscópio de epifluorescência (Axio Observer A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) usando filtro de 470-490 nm. Os zigotos foram fotografados e a porcentagem média de pixels fluorescentes foram analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J 1.40g®. Foram realizadas 4 repetições, sendo observados 25-30 zigotos por grupo.

5.2.9 Experimento 2: Transfecção de Oócitos e Embriões suínos

5.2.9.1 Construção, amplificação e purificação do vetor

O plasmídeo utilizado na transfecção dos oócitos e embriões foi o vetor com integração baseada em transposase PiggyBac, (pmhyGENIE-5), o qual contém a transposase hiperativa de piggyBac de mamífero e que codifica a proteína verde fluorescente melhorada (eGFP). O plasmídeo pmhyGENIE-5 foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Stefan Moisyadi, da Universidade do Havaí (Honolulu, Havaí, EUA). O pmhyGENIE-5 foi transformado em bactérias *E. coli* competentes (DH5 α ou DH10 β), segundo Esteves (2001) com modificações. A seleção dos clones foi obtida pela presença de canamicina em meio Luria-Bertani (LB), referente ao marcador de resistência a este antibiótico contido no plasmídeo construído, o gene KAN(R). O eDNA foi isolado utilizando Kit mini preparação plasmidial (miniprep) QIAprep (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme orientações do fabricante.

5.2.9.2 Preparação dos poliplexos

Os poliplexos foram preparados utilizando a combinação dos parâmetros otimizados nos experimentos anteriores. Foram escolhidas as concentrações 20 e 80 μ g/mL de PEI, pois foram as concentrações que apresentaram as maiores taxas de internalização da PEI-FITC. A razão de N/P de 2 foi selecionada a partir do resultado do artigo 1, onde foi observado que não existiam cargas negativas provenientes dos grupos fosfatos presentes no eDNA, e acredita-se que há PEI livre para interagir com a membrana plasmática (artigo 1). Desta forma, foram produzidos 2 poliplexos:

Para a transfecção foram produzidos 2 poliplexos:

- Poliplexo 1: 20µg/mL de PEI complexado com 150µg/mL de pmhyGENIE-5 (razão N/P=2), preparados em MIV2 ou PZM5 para transfecção de oócitos e embriões respectivamente.
- Poliplexo 2: 80µg/mL de PEI, complexadas com 600µg/mL de pmhyGENIE-5 (razão N/P=2), preparados em MIV2 ou PZM5 para transfecção de oócitos e embriões respectivamente.

5.2.9.3 Transfecção dos oócitos

Ao final do período de maturação *in vitro*, os oócitos foram desnudados e lavados em MIV2 e distribuídos para compor os tratamentos:

- Controle: Oócitos incubados com PZM5 suplementado (sem poliplexo) por 0,5h;
- INC-O20: Oócitos incubados com 150 µg/mL de pmhyGENIE5 por 0,5h;
- INC-O80: Oócitos incubados com 600 µg/mL de pmhyGENIE5 por 0,5h;
- PEI-O20: Oócitos incubados com 100 µL de poliplexo 1 por 0,5h;
- PEI-O80: Oócitos incubados com 100 µL de poliplexo 2 por 0,5h;

Ao final da transfecção os oócitos foram lavados em 3 gotas de MIV2, em seguida foram fertilizados e cultivados *in vitro* de conforme os itens 4.2.3 e 4.2.4 respectivamente.

5.2.9.4 Transfecção dos embriões

Os embriões foram produzidos *in vivo* conforme a metodologia descrita no item 5.2.5. Após a recuperação e seleção, os embriões foram distribuídos nos tratamentos:

- Controle: Embriões incubados com PZM5 suplementado (sem poliplexo) por 0,5h;

- INC-E20: Embriões incubados com 100 μ L de solução de pmhyGENIE5 (150 μ g/mL) em PZM5 por 0,5h;
- INC-E80: Embriões incubados com 100 μ L de solução de pmhyGENIE5 (600 μ g/mL) em PZM5 por 0,5h;
- PEI-E20: Embriões incubados com 100 μ L de poliplexo 1 por 0,5h;
- PEI-E80: Embriões incubados com 100 μ L de poliplexo 2 por 0,5h;

Ao final da transfecção foram lavados em 3 gotas de PZM5 suplementado e cultivados em microgotas de 100 μ L de PZM5 suplementado, cobertas com óleo mineral em estufa 5% de CO₂ em estufa a 38,5°C e alta umidade por 5 dias.

5.2.9.5 Avaliação do desenvolvimento embrionário

A clivagem foi no 3º dia após a fertilização *in vitro*, onde foram considerados clivados os embriões que apresentavam duas ou mais células, sem sinais de fragmentação ou degeneração celular. As taxas de produção embrionária foram avaliadas no 7º dia de cultivo *in vitro* para oócitos e no 5º dia do cultivo *in vitro* para embriões.

5.2.9.6 Avaliação da expressão GFP

A expressão de GFP foi avaliada nos blastocistos produzidos a partir de oócitos transfectados no 7º dia do cultivo *in vitro*. Enquanto os blastocistos obtidos a partir da transfecção de embriões no 5º dia do cultivo *in vitro*. A expressão da proteína GFP foi observada por microscopia de fluorescência usando filtro de filtro de 470-490 nm do microscópio de epifluorescência (Axio Observer A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha).

5.3 ANÁLISE ESTÁTISTICA

A taxa de internalização de PEI-FITC, taxas de desenvolvimento embrionário e expressão de GFP, foram avaliados por ANOVA usando PROC MIXED (SAS®). Foi utilizado o LSMEANS (média dos quadrados mínimos) para obtenção das médias ajustadas dos tratamentos, com comparações utilizando-se o Teste Tukey com 5% de significância. Os dados foram apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens \pm EP.

5.4 RESULTADOS

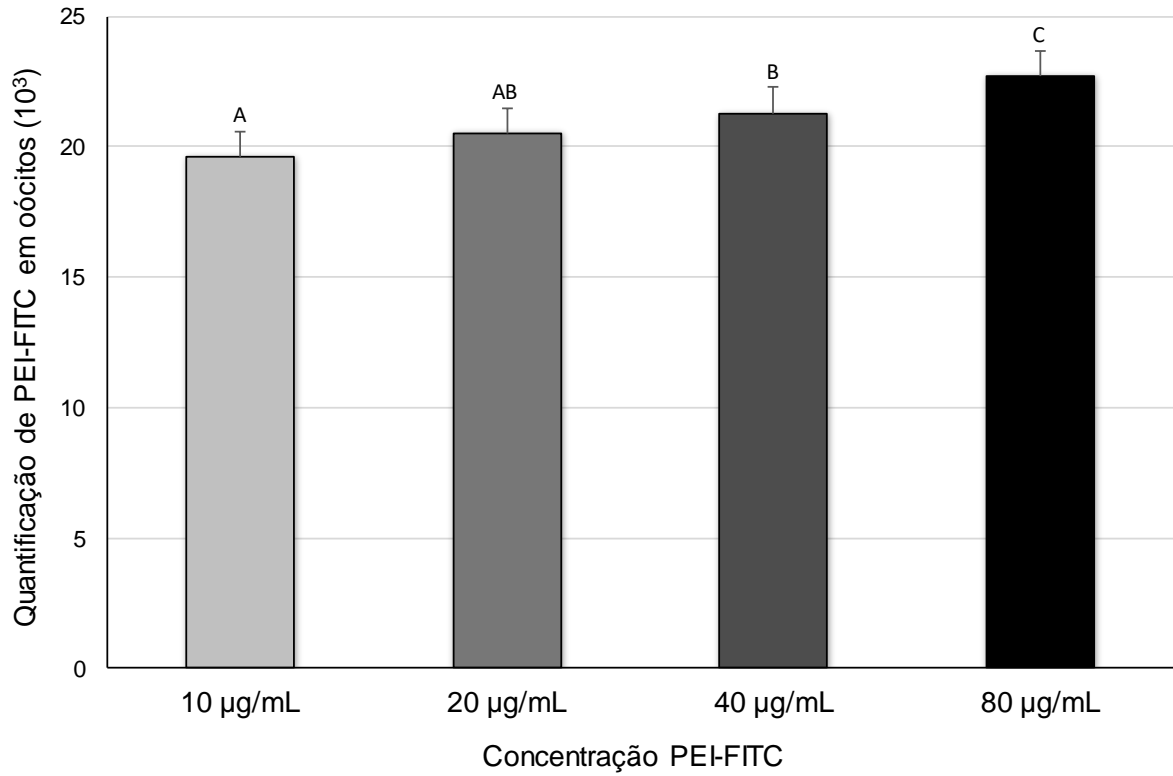
5.4.1 Experimento 1: Avaliação da internalização da PEI-FITC

5.4.1.1 Oócitos

A internalização da PEI/FITC em oócitos sofreu efeito da concentração, ou seja, quanto maior a concentração de PEI/FITC utilizada, maior a média de pixels fluorescentes, indicando maior internalização da PEI (Figura 2).

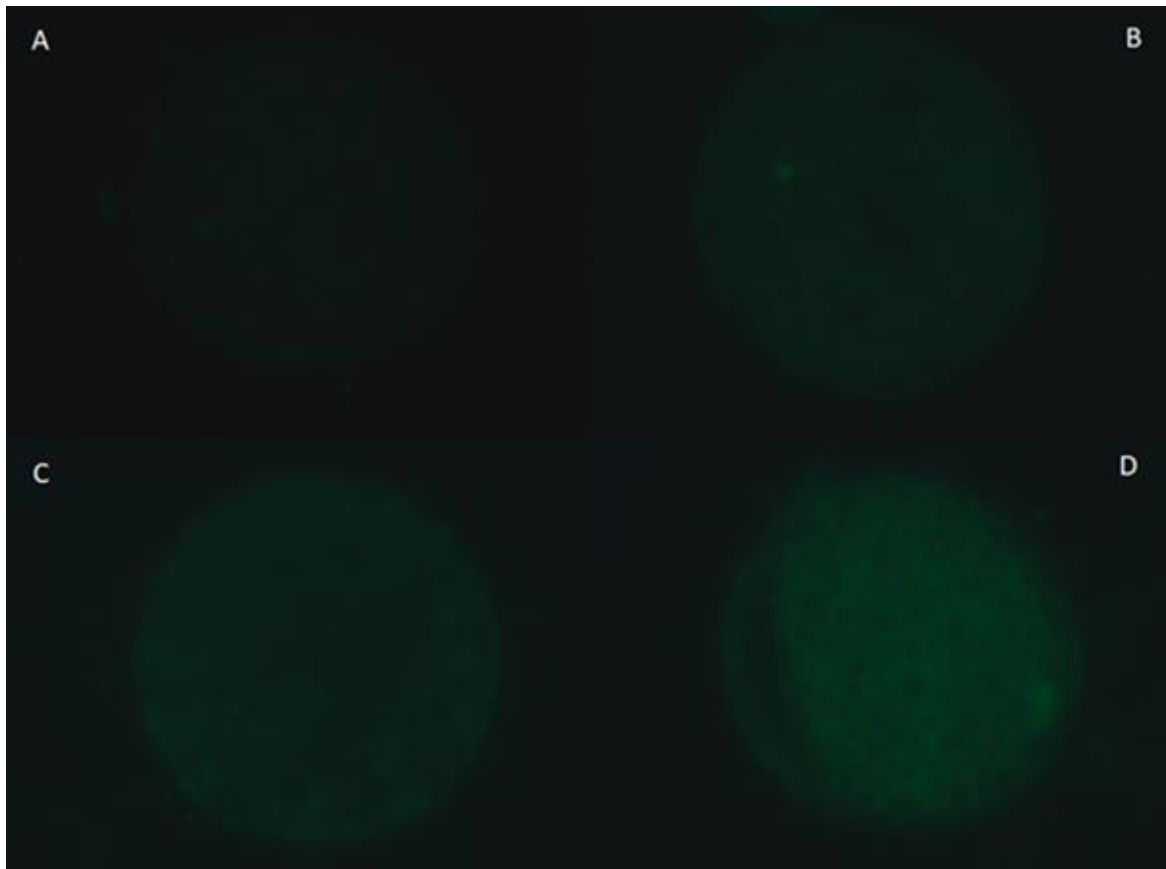
Os oócitos tratados com as concentrações de PEI/FITC de 10 e 20 μ g/mL não diferiram entre si ($p=0,0885$) e apresentaram as menores taxas de internalização de PEI-FITC (quantificação média de 19602 e 20503 pixels respectivamente). Porém, a concentração PEI-FITC de 10 μ g/mL diferiu das concentrações de 40 μ g/mL ($p<0.0001$) e 80 μ g/mL ($p<0.0001$). Enquanto, a concentração de PEI-FITC de 20 μ g/mL não diferiu da 40 μ g/mL ($p=0,1515$), mas diferiu da concentração de 80 μ g/mL ($p<0.0001$). A concentração de 40 μ g/mL apresentou uma taxa de internalização de PEI-FITC intermediária (quantificação média de 21280 pixels) diferindo da concentração de 80 μ g/mL ($p=0.0003$), que apresentou a maior taxa de internalização de PEI-FITC (quantificação média de 22693 pixels). As imagens dos oócitos expostos as diferentes concentrações de PEI-FITC avaliados em microscópio de fluorescência estão apresentadas na figura 3.

Figura 2 – Média da concentração de PEI-FITC (média de pixels) em oócitos suínos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC, analisadas utilizando o software de análise de imagens ImageJ 1.40g®. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

Figura 3 - Oócitos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC avaliados em microscópio de fluorescência. A: Concentração 10ug/mL; B: Concentração 20ug/mL; C: Concentração 40 ug/mL e D: Concentração 80 ug/mL.



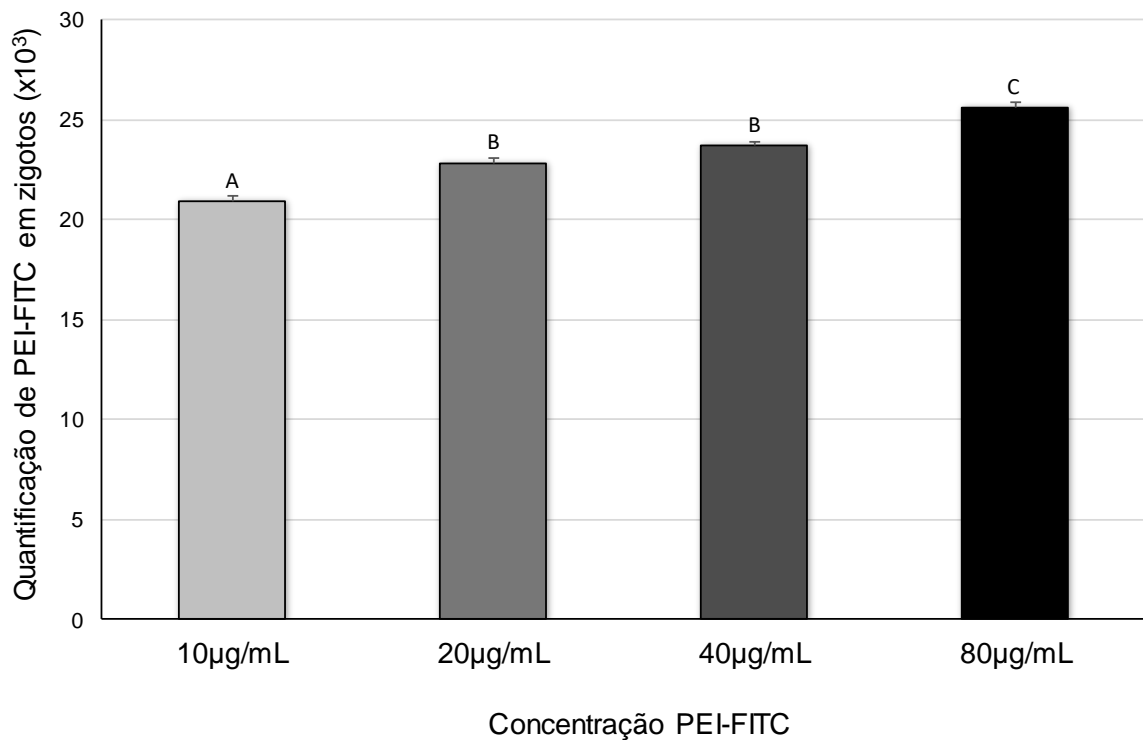
Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

5.4.1.2 Zigotos

A internalização da PEI/FITC em zigotos sofreu efeito da concentração, e assim como em oócitos foi possível observar que quanto maior a concentração maior a quantificação de PEI-FITC (média de pixels), ou seja, maior internalização da PEI ($p < 0,0001$) (Figura 4). Os zigotos tratados com as concentrações de PEI/FITC de 10 μ g/mL apresentaram a menor taxa de internalização de PEI-FITC (quantificação média de 20933 pixels), diferindo das concentrações 20 μ g/mL ($p = 0,0116$) 40 μ g/mL ($p < 0,0001$) e 80 μ g/mL ($p < 0,0001$). Enquanto as concentrações 20 μ g/mL e 40 μ g/mL não diferiram entre si ($p = 0,3716$) e apresentaram taxas intermediárias de internalização de PEI-FITC (quantificação média de 22817 e 23673 pixels respectivamente). Mas ambas as concentrações diferiram de 80 μ g/mL ($p < 0,0001$; $p = 0,0020$ respectivamente), a qual apresentou a maior taxa de

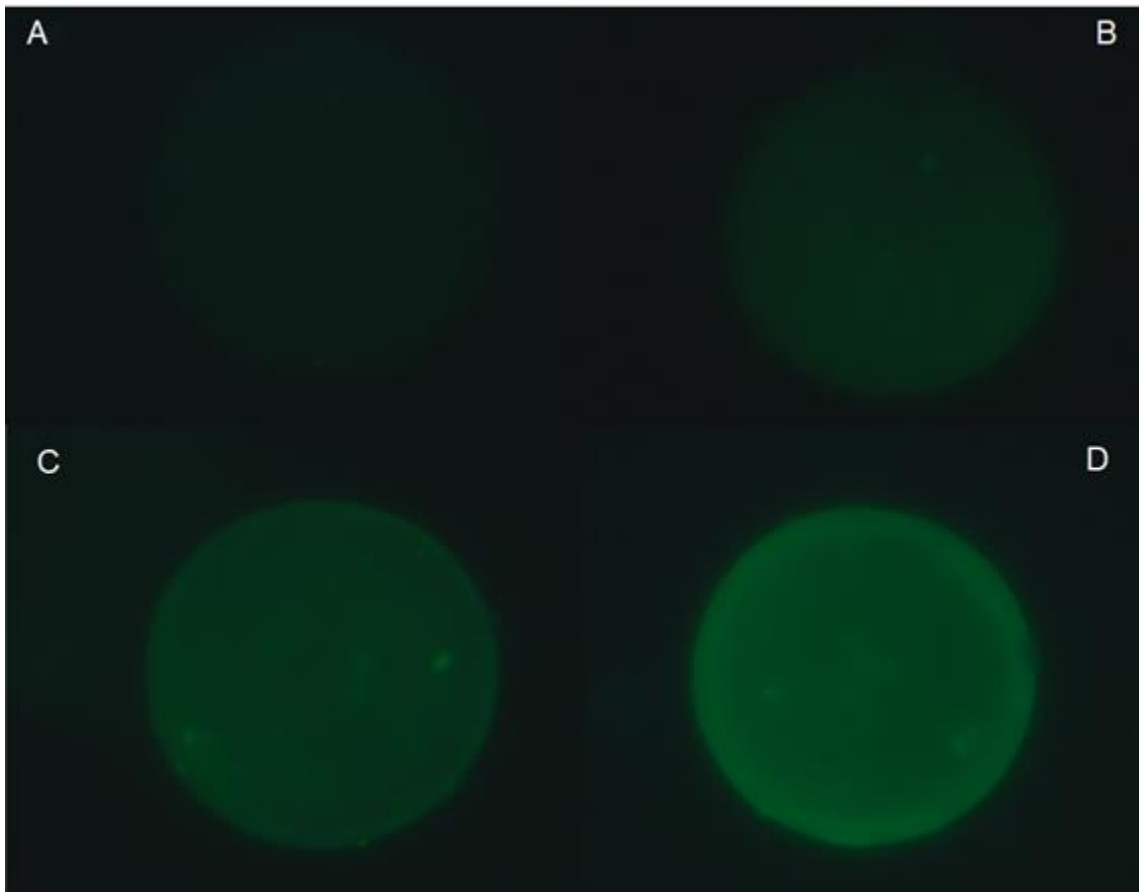
internalização de PEI-FITC (quantificação média de 25603 pixels). As imagens dos zigotos tratados com as diferentes concentrações de PEI-FITC e avaliados através de microscopia de fluorescência estão apresentadas na figura 5.

Figura 4 - Média da concentração de PEI-FITC (média de pixels) em zigotos suínos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC, analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J 1.40g®. Letras sobrescritas representam diferença significativa ($p < 0,05$)



Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

Figura 5 - Zigotos tratados com diferentes concentrações de PEI-FITC avaliados em microscópio de fluorescência. **A:** Concentração 10ug/mL; **B:** Concentração 20ug/mL; **C:** Concentração 40 ug/mL e **D:** Concentração 80 ug/mL.



Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

5.4.2 Transfecção de Oócitos e Embriões suínos

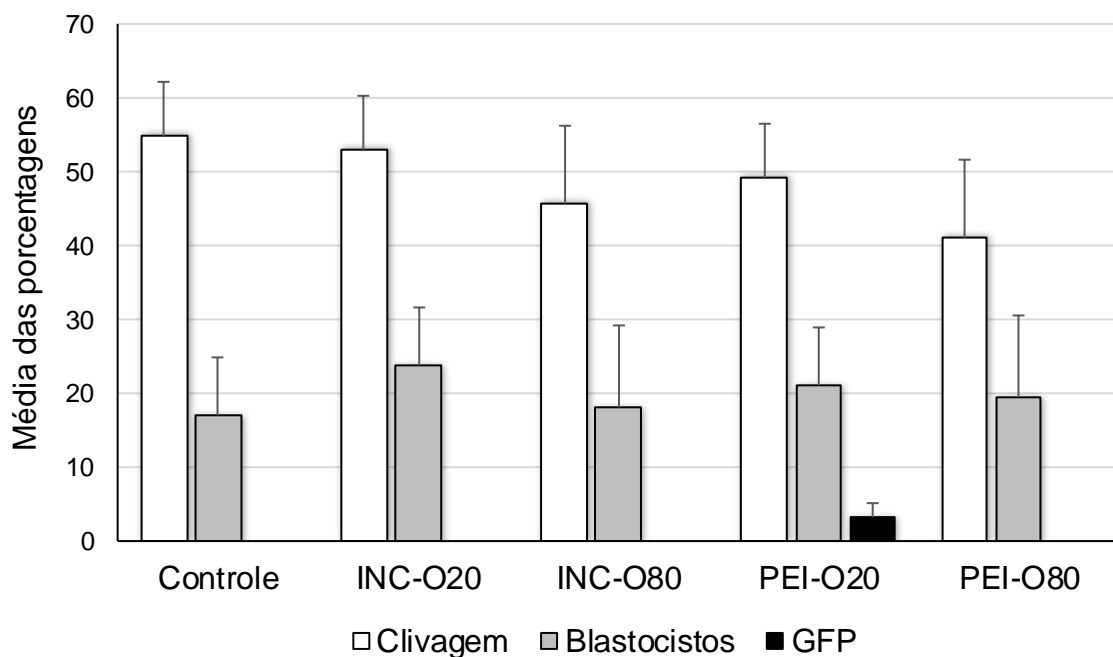
5.4.3 Desenvolvimento Embrionário e Expressão de GFP

5.4.3.1 Oócitos

Na figura 6, estão demonstrados os resultados de desenvolvimento embrionário e expressão de GFP de blastocistos produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* transfectados com PEI e posteriormente fertilizados e cultivados *in vitro*. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para taxa de clivagem avaliados no dia 3 após a fertilização *in vitro* ($p= 0,8307$). A taxas de clivagem dos grupos controle, INC-O20, INC-O80, PEI-O20, PEI-O80 foram $54,83\% \pm 7,46$, $53,01\% \pm 7,46$, $45,83\% \pm 10,55$, $49,17\% \pm 7,46$ e $41,19\% \pm 10,55$, respectivamente. A

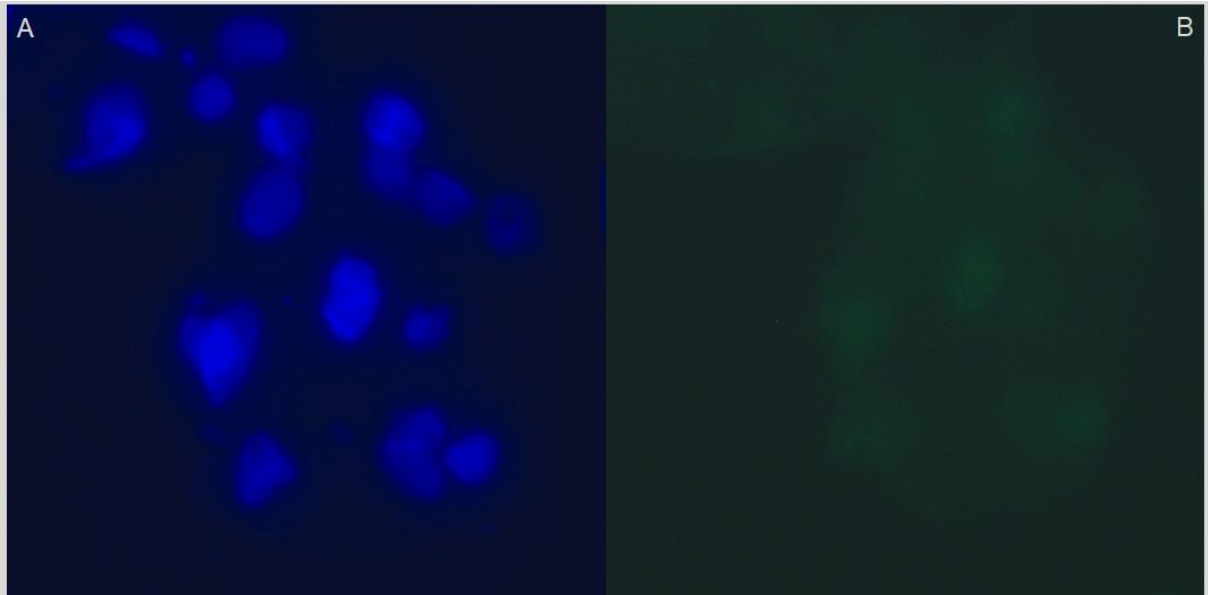
taxa de blastocisto avaliada no dia 7 pós fertilização também não apresentou diferença entre os tratamentos ($p=0,9780$), as taxas de blastocisto observadas foram de $16,96\pm 7,81$, $23,68\pm 7,81$, $18,05\pm 11,04$, $21,07\pm 7,81$ e $19,52\pm 11,04$, para os grupos controle, INC-O20, INC-O80, PEI-O20, PEI-O80 respectivamente. Quanto a taxa de blastocisto GFP positivo, foi identificado apenas 1 blastocisto transgênico para proteína verde fluorescente, pertencente ao grupo PEI-O20 (Figura 7).

Figura 6 - Média das porcentagens de clivagem, blastocistos e blastocisto GFP positivos dos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.



Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

Figura 7 - Avaliação da expressão gênica do blastocisto produzido a partir de oócitos transfectados com pmhyGENIE-5 mediado por PEI na concentração de 20 µg/mL, razão n/p=2 por 0,5h (PEI-O20). **A:** Blastocisto em eclosão marcado com Hoescht em luz ultravioleta. **B:** Blastocisto em eclosão expressando proteína verde fluorescente em luz ultravioleta.

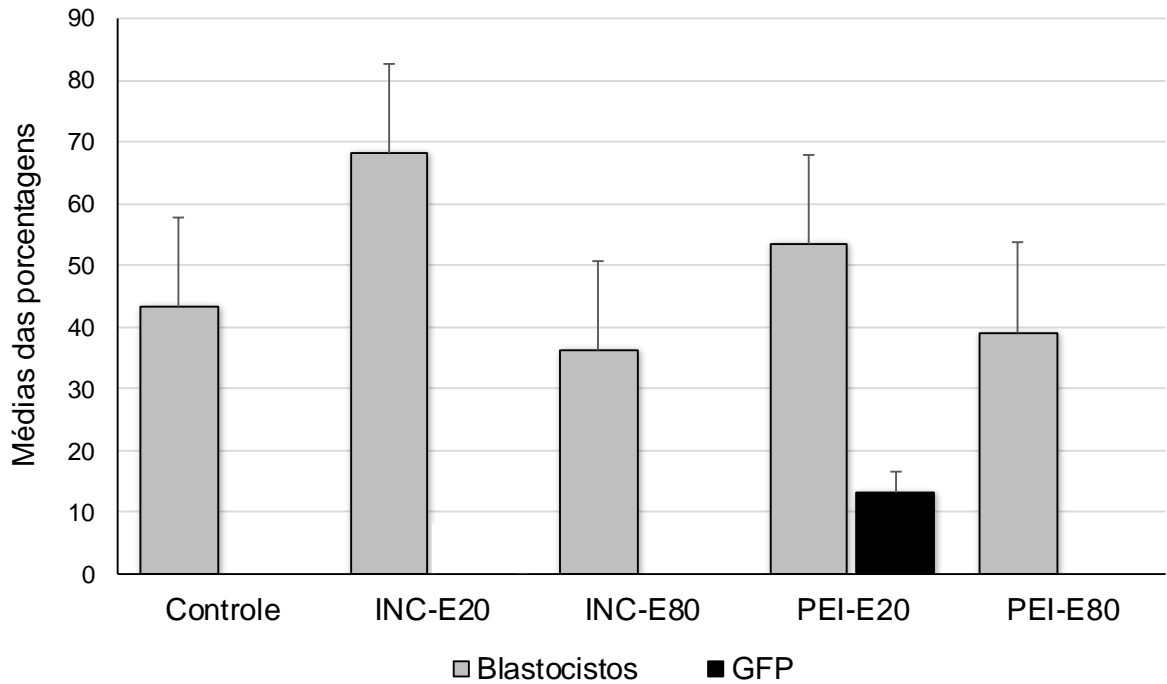


Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

5.4.3.2 Embriões

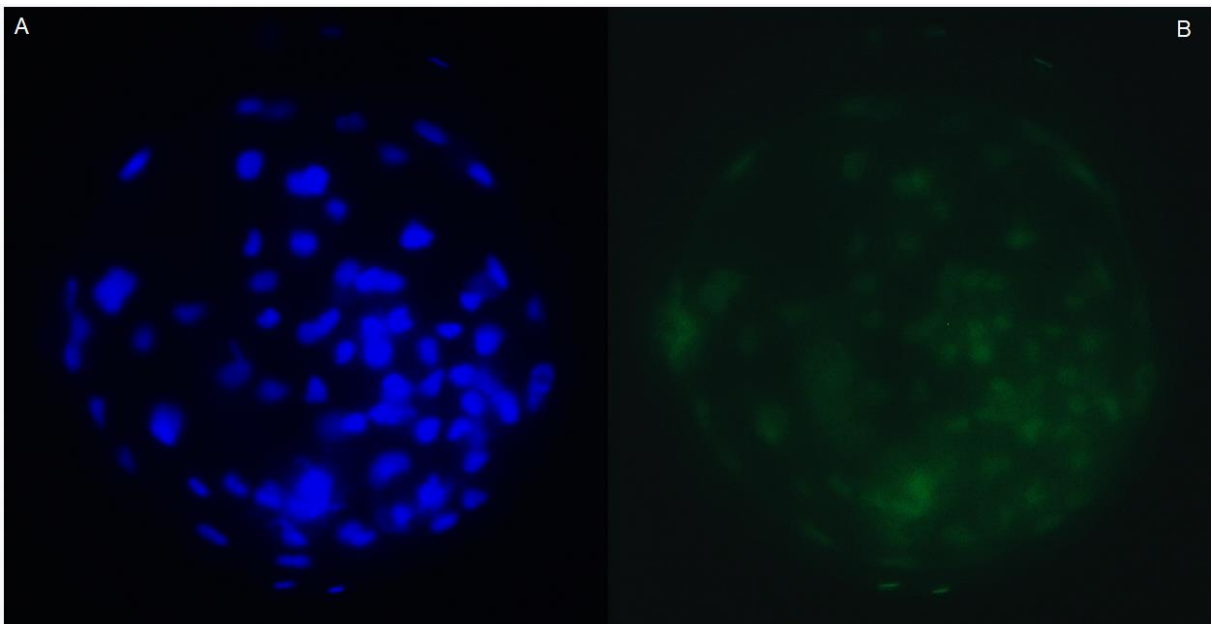
Na figura 8, estão demonstrados os resultados de desenvolvimento embrionário e expressão de GFP em blastocistos produzidos a partir de embriões produzidos *in vivo* transfectados com PEI e posteriormente cultivados *in vitro*. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as taxas de blastocisto avaliadas no 5º dia do cultivo *in vitro* ($p= 0,5525$). A taxas de blastocistos dos grupos controle, INC-E20, INC-E80, PEI-E20, PEI-E80 foram $43,33\% \pm 15,51$, $68,05\% \pm 14,51$, $36,11\% \pm 14,51$, $53,41\% \pm 14,51$ e $39,14\% \pm 14,51$, respectivamente. Quanto a taxa de blastocisto GFP positivo, da mesma forma que ocorreu na transfecção dos oócitos foi identificado 1 blastocistos transgênicos para proteína verde fluorescente, pertencente ao grupo PEI-E20 (Figura 9).

Figura 8 - Média das porcentagens, blastocistos e blastocisto GFP positivos nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.



Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

Figura 9 - Avaliação da expressão gênica do blastocisto produzido a partir de embriões produzidos *in vivo* transfectados com pmhyGENIE-5 mediado por PEI na concentração de 20 μ g/mL, razão n/p=2 por 0,5h (PEI20). **A:** Blastocisto expandido marcado com Hoescht em luz ultravioleta. **B:** Blastocisto expandido expressando proteína verde fluorescente em luz ultravioleta.



Fonte: Elaborado pela Autora, 2019.

5.5 DISCUSSÃO

A entrega de ácidos nucleicos usando PEI é um processo complexo que depende de vários fatores, entre eles a condensação do DNA, captação celular e a liberação do ácido nucleico. Neste sentido, a eficiência da transfecção e consequentemente a produção de blastocistos transgênicos requer a otimização dos parâmetros que podem influenciar na a entrega do eDNA mediado por PEI em oócitos e embriões.

Quando se trata de oócitos e embriões a maior dificuldade das técnicas de transfecção estão relacionadas a zona pelúcida. A zona pelúcida é uma matriz extracelular glicoproteica que envolve os oócitos e embriões dos mamíferos. A zona pelúcida realiza a comunicação entre oócitos e células foliculares durante a oogênese, regula as interações entre oócitos e espermatozoides durante a fertilização e protege oócitos e embriões durante o desenvolvimento. Por esse motivo, ela atua como uma barreira física que evita a entrada de agentes externos, como vetores de entrega de eDNA. Desta forma, a primeira etapa deste trabalho consistiu em verificar a capacidade da PEI em atravessar a zona pelúcida e a membrana citoplasmática. Foi observado que todas as concentrações de PEI estudadas (10, 20, 40 e 80µg/mL) foram capazes de transpor a zona pelúcida e alcançarem o citoplasma de oócitos e zigotos. A taxa de internalização da PEI-FITC foi proporcional a concentração, sendo que a concentração 10µg/mL resultou na menor taxa de internalização, as concentrações de 20 e 40µg/mL resultaram em taxas de internalização intermediárias e similares enquanto a concentração de 80µg/mL proporcionou a maior taxa de internalização. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar a capacidade da PEI em atravessar a zona pelúcida de oócitos maturados e zigotos, desta forma abrindo a possibilidade de utilização deste polímero com a finalidade de transfecção, tendo este um grande potencial de utilização, pois apresenta baixo custo e não requer equipamentos sofisticados, além de poder promover a transfecção de forma rápida em um grande número de células ao mesmo tempo.

A partir destes resultados, foram selecionados as concentrações de 20 e 80µg/mL de PEI para preparar os políplexos. Ambas as concentrações foram combinadas com a razão N/P igual a 2 e o período de transfecção de 0,5h

(parâmetros otimizados no capítulo 1). Foram avaliados o efeito da PEI sobre o desenvolvimento embrionário e a expressão de GFP dos blastocistos.

Foi demonstrado que ambas as concentrações de PEI estudadas não comprometeram o desenvolvimento embrionário, ou seja, nas condições avaliadas a PEI não foi embriotóxica. Vale ressaltar que estudos envolvendo a citotoxicidade da PEI são inexistentes para oócitos e embriões. Dentre os períodos críticos de desenvolvimento de um organismo destaca-se a fase pré-implantacional, possivelmente devido a existência de células ainda indiferenciadas. Um distúrbio nesta etapa pode causar falhas na implantação ou levar a danos nos processos de divisão celular e diferenciação que originarão os tecidos fetais (ZALGEVIČIENĖ et al., 2012). Lesões nas células embrionárias acarretam em maior proporção de embriões não eclodidos ou degenerados (LEIDENFROST et al., 2011). Neste sentido, as taxas de desenvolvimento embrionário encontradas no presente trabalho sugerem que as concentrações de PEI avaliadas (20 e 80µg/mL) não influenciaram a cinética de desenvolvimento e a sobrevivência de embriões suínos. Este resultado é extremamente relevante, pois existe uma carência de informações sobre o efeito da PEI nas células avaliadas, especialmente em suínos, que é a espécie que se destaca como modelo de estudo humano. Adicionalmente, estes resultados abrem uma real possibilidade para que a PEI seja um agente transfectante de ácidos nucleicos ou moléculas terapêuticas para oócitos e embriões suínos.

Quanto a expressão de GFP, observamos que a PEI foi capaz de transfectar oócitos e embriões suínos e gerar blastocistos transgênicos para GFP. Foi verificado que os 2 blastocistos transgênicos produzidos, foram transfectados a partir de oócitos e embriões transfectados com o poliplexo 1 (20µg/mL de PEI; razão N/P igual a 2, incubação de 0,5h). Esses resultados indicam que a PEI foi capaz de passar pela zona pelúcida e o plasmídeo atingiu o núcleo do zigoto, sendo, o gene transcrito e traduzido na proteína verde fluorescente de forma não transiente. Coonrod e Horwitz (1997) observaram que a integridade do DNA que chega ao núcleo parece ser determinante para a eficiência de transferência gênica. De fato, a degradação dos ácidos nucleicos por nucleases citoplasmáticas durante a internalização celular ou trânsito até o núcleo, bem como a fusão de endossomos contendo o DNA exógeno com os lisossomos é determinante para o sucesso da transfecção (WATTIAUX et al., 2000; SANZ et al., 2011). Nesse aspecto, o efeito “esponja de elétrons” proposto para PEI poderia constituir uma vantagem, visto que o eDNA recebe proteção

adicional contra a degradação. Outra possível explicação para a estabilidade da transfecção pode estar relacionada a natureza do plasmídeo. O plasmídeo utilizado foi o vetor com integração baseada no transposon PiggyBac. Os transposons são elementos genéticos móveis que agem através de mecanismo de transposição do tipo “corta e cola” através da enzima transposase. As transposases reconhecem e se ligam aos transposons flanqueadores de elementos de repetição invertidos, cortam esse segmento de DNA do doador e o reinserem no genoma receptor. Essas propriedades provaram ser uma ferramenta inestimável para entrega de genes em aplicações como transgênese, mutagênese para pesquisa de câncer ou terapia gênica. Marh et al. (2012), demonstrou uma eficiência 5 vezes maior na produção de camundongos transgênicos ao realizar a microinjeção pronuclear utilizando o vetor piggyBac. Neste sentido, o mecanismo de escape lisossomal da PEI combinado com a natureza do plasmídeo pode estar relacionado na estabilidade da expressão de GFP mostrada neste trabalho

Existem poucos estudos com transfecções bem sucedidas em oócitos e embriões com a zona pelúcida intacta. As técnicas mais utilizadas são a eletroporação e a microinjeção (GRABAREK et al. 2002; HOFMANN et al., 2003). Vetores virais necessitam de remoção da zona pelúcida, uma vez que esta confere proteção contra agentes infecciosos (PFEIFER et al., 2004). Carballada, Degefa, Esponda, et al. (2000) demonstram que os lipossomas catiônicos foram capazes de transfectar oócitos imaturos com a zona pelúcida intacta, mas oócitos maturados e embriões precisaram da prévia permeabilização da zona pelúcida. Este trabalho demonstrou pela primeira vez a eficiência da PEI em transfectar oócitos e embriões com zona pelúcida intacta e gerar blastocistos transgênicos.

Um importante fator que também deve ser levado em consideração nos resultados obtidos é a fase do ciclo celular e do estado da cromatina em que os oócitos e embriões encontravam-se no momento da transfecção. No presente estudo a transfecção dos oócitos foi realizada em oócitos maturados, o que sugere que eficiência do políplexo pode estar associado à ausência do envelope nuclear, que é característico da MII. A ausência do envelope nuclear, pode facilitar o contato do eDNA com a cromatina, permitindo uma maior eficiência na integração do gene no genoma. Deste modo, os genes têm a probabilidade de serem inseridos antes da fecundação (CHAN et al., 1998; CHAN et al., 2001). Estudos sugerem que para embriões, o momento ideal para transfecção seria na fase S (4 a 24 horas após

início da fecundação) quando os sítios de integração estão mais acessíveis. Porém, na espécie suína existe uma grande variação na duração do cio (24 a 108 horas) e no intervalo entre o início do cio e a ovulação (16 a 96 horas) (VIANA et al., 1999). Devido a essas questões, as coletas dos embriões produzidos *in vivo* foram realizadas 1 dia após a última inseminação, no entanto, pela grande variação do momento da ovulação, os zigotos coletados variaram entre os estágios de 1-4 células. O uso da PEI como vetor de entrega de genes em oócitos e embriões suínos é bastante promissor como método alternativo para entrega de eDNA, devido à sua simplicidade e boa eficiência.

5.6 REFERÊNCIAS

CARBALLADA, R.; RELLOSO, M.; ESPONDA, P. Generation of transgenic mice by transfection of pronuclear embryos using lipid-DNA complexes. **Zygote**, v. 10, n. 3, p. 209-216, ago. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214801>. Acesso em: 24 nov. 2018.

CHAN, A. W. S. *et al.* Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer into oocytes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 95, p. 14028- 14033, nov. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24320/>. Acesso em: 15 nov. 2018.

CHAN, A. W. *et al.* Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. **Science**, v. 291, n. 5502, p 309-312, jan. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11209082>. Acesso em: 19 nov. 2018.

COONROD, A.; LI, F. Q.; HORWITZ, M. On the mechanism of DNA transfection: eficiente gene transfer without viruses. **Gene Ther.**, v. 4, n. 12, p. 1313-1321, dez. 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472555>. Acesso em: 15 out. 2019.

GAO, X.; KIM, K.S.; LIU, D. Nonviral gene Delivery: What we know and what is next. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 92-104, mar. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408239>. Acesso em 17 jan. 2019.

GRABAREK, J. B. *et al.* Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. **Genesis**. v.32, p.269-276, abril 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948914>. Acesso em 22 nov. 2018.

HOFMANN, A. *et al.* Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. **EMBO Reports**, v. 4, n. 11, p. 1054-1060, nov. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1326377/>. Acesso em: 2 out. 2018.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 286-294, jun. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158058>. Acesso em: 23 nov. 2018.

LEIDENFROST, S. et al. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22121, jul 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811561>. Acesso em: 23 nov. 2018.

LUNGWITZ, U.; BREUNIG, M.; BLUNK, T.; GO"PFERICH A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60 p. 247–266, jul. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939236>. Acesso em: 25 nov. 2018.

MARH, J. et al. Hyperactive self-inactivating piggyBac for transposase-enhanced pronuclear microinjection transgenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.20, p.19184-19189, nov. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093669>. Acesso em: 20 nov. 2018.

OTERO, A. R. J. **Classificação de Ovocitos Imaturos de Bovinos pela Utilização do Azul Cresil Brillhante**. 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/4962>. Acesso em: 17 nov. 2018.

PFEIFER, A. Lentiviral transgenesis. **Transgenic Research**, v. 13, p. 513-522, dez.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15672832>. Acesso em: 20 nov. 2018.

SANZ, V. *et al.* Protamine and chloroquine enhance gene delivery and expression mediated by RNA-wrapped single walled carbon nanotubes. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 12, n.3, p.1739-1747, mar. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754975>. Acesso em: 21 nov. 2018.

VIANA, C.H.C. *et al.* Relações entre as características intervalo desmame-cio, duração do cio e momento da ovulação, diagnosticada pela ultra-sonografia em fêmeas da espécie suína. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 4, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95961999000400008&script=sci_abstract&lng=pt. Acesso em: 22 nov. 2018.

WATTIAUX, R. *et al.* Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 41, n. 2, p. 201-208, mar. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X99000666>. Acesso em: 10 nov. 2018.

YAMANO, S.; DAI, J.; MOURSI, A. M. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 287-300, nov. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585901>. Acesso em: 25 nov. 2018.

ZALGEVIČIENĖ, L. et al. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. **Medicina (Kaunas)**. v. 48, n. 5, p. 256-264, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864273>. Acesso em: 25 nov 2018.

6 CONCLUSÕES

O protocolo constituído por PEI na concentração de 10µg/mL, combinado com a razão N/P de 2, com incubação de 0,5h, foi capaz de transfectar com sucesso fibroblastos fetais suínos, sendo que a percentagem de células GFP positiva se manteve constante ao longo do tempo avaliado, sem causar lesão de membrana significativa nos fibroblastos. Também foi estabelecido que o protocolo constituído por PEI na concentração de 20µg/mL, combinado com a razão N/P de 2, com incubação de 0,5 horas, foi capaz de ultrapassar a zona pelúcida, transfectar oócitos maturados *in vitro* e embriões produzidos *in vivo* e gerar blastocistos transgênicos para GFP sem prejudicar o desenvolvimento embrionário

Portanto, os protocolos de transfecção baseados em polietilenoimina desenvolvidos neste trabalho mostraram-se eficientes e seguros para transfecção de fibroblastos, oócitos e embriões suínos.