

EFEITO DO USO DE LIPOFECTAMINE™ 2000 E POLIETILENOIMINA (PEI) NA TRANSFEÇÃO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE EM FIBROBLASTOS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Thamiris Dornelas de Araújo*

Michele Munk Pereira**

Luiz Sérgio de Almeida Camargo***

RESUMO

A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) associada à transgênese constitui promissora ferramenta na geração de bovinos com características de interesse zootécnico, contudo o estabelecimento de métodos eficientes de transfecção das células doadoras de núcleo e de linhagens celulares transgênicas ainda enfrenta dificuldades. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência dos carreadores de DNA Lipofectamine™ 2000 e Polietilenoimina (PEI) na transfecção de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com vetores plasmidiais, contendo o transgene da proteína verde fluorescente (GFP). Após incubação a 37,0°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, os fibroblastos bovinos em 80% confluência em meio de cultivo sem SFB e antibiótico foram transfectados com Lipofectamine™ 2000 ou PEI por 5h. As células foram avaliadas 48, 96, 192, 264 e 384h após transfecção quanto à expressão da GFP em microscopia epi-fluorescente. As amostras foram tripsinizadas e analisadas quanto à viabilidade (48h pós-transfecção) por coloração com Azul de Trypan em microscopia de campo claro. Um grupo de células sem exposição aos agentes de transfecção foi utilizado como controle. Os resultados foram analisados por ANOVA. Encontrou-se maior proporção de células positivas para GFP na transfecção com Lipofectamine (8,76±1,48%) em relação a PEI (2,66±0,65%) após 48h. Todos os tratamentos culminaram na total ausência de fluorescência após 384h. Houve diferença (P<0,05) na viabilidade entre as células transfectadas e o controle, mas não entre os métodos de transfecção. Conclui-se que, nas condições testadas, a Lipofectamine™ 2000 é mais eficiente, porém após 384h ocorre total silenciamento da expressão.

Palavras-chave: Animais transgênicos. Transferência nuclear. Métodos de transfecção.

1 INTRODUÇÃO

A manipulação genética e o conhecimento crescente em biologia molecular abrem espaço para intervenções que vão desde o desenvolvimento de vacinas de DNA e

* Mestranda em Ciências Biológicas, concentração em Genética e Biotecnologia pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). E-mail: thamirisdornelas@gmail.com

** Doutorado em Saúde pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). E-mail: mimunkbio@gmail.com

*** Doutorado em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

manipulação de células-tronco até a produção de organismos resistentes a pragas ou que expressem características desejáveis comercialmente. A possibilidade de clonar animais, associada à modificação genética de núcleos doadores, tem sido muito explorada para o estabelecimento de metodologias na geração de animais geneticamente modificados (IGUMA et al., 2005).

Nesse contexto, a produção de bovinos geneticamente modificados para características de interesse é uma promissora ferramenta na pecuária. Desse modo, a transgenia pode ser usada para acelerar o melhoramento genético, introduzindo características que levariam gerações para serem inseridas em uma raça. Bovinos transgênicos expressando no leite maiores teores de proteína (LAIBLE et al., 2007) ou lipídeos da classe ômega 3 (WU et al., 2012) já foram gerados e servem como prova de conceito.

A transferência nuclear com células somáticas (TNCS) associada à transgênese tem sido um procedimento bastante utilizado na geração de bovinos geneticamente modificados (ARAT et al., 2002; HOUDEBINE, 2002; IGUMA et al., 2005; ZHONGHUA et al., 2008, Liu et al., 2013). No entanto, além dos problemas inerentes ao processo de TNCS, como a reprogramação genética incompleta da célula doadora (DANIELLS, HALL, TROUSON, 2000), 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). O conhecimento acerca do comportamento celular após a integração de uma sequência de DNA exógena ainda é insuficiente, o que reflete as baixas taxas de blastocistos geradas por TNCS associadas à modificação genética (SUN et al., 2009).

Entre os métodos potencialmente disponíveis para a entrega de genes em células doadoras de núcleo, estão a microinjeção (YANG et al., 2008), a eletroporação (KNUTSON; YEE, 1987; ANDREASON; EVANS, 1989), o uso de vetores lentivirais (BRESSAN, 2008), a lipofecção (FELGNER et al., 1987) e o uso de polímeros catiônicos (PHAM; KAMEN; DUROCHER, 2006). A utilização de lipossomos tem sido descrita como a mais simples e segura metodologia de transfecção em células doadoras (OLIVEIRA et al., 2005; LISAUSKAS, 2008), mas a taxa de embriões transgênicos produzidos ainda é muito baixa (LISAUSKAS, 2008). Polissomos têm sido descritos em ensaios clínicos de terapia gênica (SHARMA et al., 2011), porém pouco se conhece sobre seu uso em células bovinas.



Na lipofecção, lipídeos catiônicos interagem com as cargas negativas do DNA e formam com ele um complexo ligeiramente catiônico. Esse complexo pode se fundir à membrana plasmática ou adentrar a célula via endocitose (WAGNER; CULMSEE; BOECKLE, 2005) por ligação da superfície da membrana com protoglicanos e caderinas (KELLER, 1999). Em células que se dividem constantemente, a entrada do DNA no núcleo é facilitada pela constante desorganização da membrana nuclear, mas em células que não se dividem ainda não se sabe se o DNA adentra o núcleo pelos poros via transporte passivo ou se é transportado ativamente (OLIVEIRA, 2006). Essa última hipótese tem sido considerada a mais provável já que os poros nucleares possuem alta seletividade, principalmente para moléculas maiores.

Tem-se descrito o uso do polissomo 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), além de apresentar uma melhor relação custo-benefício quando comparado a outros agentes (FUKUMOTO et al., 2010). Acredita-se que o poliplexo atue diminuindo a tendência de fusão endossomal e favorecendo a entrada do DNA ao núcleo (KUNATH et al., 2003).

O presente trabalho tem por objetivos avaliar a eficiência dos métodos de lipofecção e polifecção no carregamento de vetores plasmidiais para fibroblastos bovinos e seu efeito na viabilidade celular.

1. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais.

1.1. OBTENÇÃO, CULTIVO E PREPARO DAS CÉLULAS PARA TRANSFEÇÃO

Os fibroblastos utilizados no experimento foram obtidos a partir de um banco de células em terceira passagem e criopreservadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, EUA) com 20% de soro fetal bovino (SFB, Sigma, St. Louis, EUA) e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma), mantidas em nitrogênio líquido (N₂). O banco de células foi gerado a partir de uma pequena porção de tecido extraída da orelha de uma vaca Gir. Após o descongelamento, os fibroblastos foram cultivados por

aproximadamente 48h em placas de quatro poços no meio DMEM acrescido de 10% de SFB e 1% de Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma) até atingirem 80% de confluência. O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 37°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. Aproximadamente 30 min antes do início do preparo da solução de transfecção, o meio das células foi totalmente substituído por 400 µL (PEI) ou 450µL (Lipofectamine™ 2000) de DMEM desprovido de antibiótico e SFB.

Os fibroblastos foram distribuídos para compor os grupos controle (sem exposição a pDNA nem a agente transfectante), transfectados com PEI e transfectados com Lipofectamine™ 2000. Foram totalizadas duas repetições, cada uma com quatro replicatas por tratamento.

1.2. TRANSFECÇÃO DOS FIBROBLASTOS

Para a transfecção dos fibroblastos, utilizou-se o plasmídeo (pDNA) pLL 3.7 (Addgene, Cambridge, EUA) com o gene da proteína fluorescente verde (GFP) sob controle do promotor citomegalovírus (CMV) e os carreadores polietilenoimina 25kDa (PEI; Sigma) ou Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Para cada replicata, foram utilizados 2µg de pDNA e 2µL de PEI (solução a 18mM) ou Lipofectamine™ 2000 (1mg/mL), ambos na relação de 1µg:1µL. O número de células fluorescentes foi contabilizado após 48h, 96h, 192h, 264h e 384h de transfecção.

1.2.1. Transfecção com PEI

Foram preparadas duas soluções (protocolo adaptado de TOLEDO et al., 2008), uma contendo o pDNA + glicose a 5% e outra contendo PEI 18mM + glicose a 5%, ambas totalizando 100µL cada. Após rápida homogeneização em vórtex, as soluções foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 5 min e, posteriormente, unidas em vórtex por 1 min. O mix permaneceu em repouso durante mais 15 min para a formação dos complexos. Em seguida foram acrescentados ao tubo 200µL de DMEM sem SFB, totalizando 400µL. Em cada um dos poços das replicatas, foram pipetados 100µL do complexo pDNA:PEI produzido, totalizando um volume de transfecção final de 500µL por poço. A concentração final de pDNA por replicata foi de 4,0µg de pDNA:mL



Os complexos pDNA: PEI foram mantidos em contato com as células por 5h, período após o qual o meio foi substituído por DMEM a 10% de SFB e 1% de antibiótico, procedendo-se normalmente o cultivo.

1.2.2. Transfecção com Lipofectamine™ 2000

As diluições de pDNA e Lipofectamine™ 2000, bem como os tempos de incubação, foram realizados segundo o protocolo do fabricante do agente transfectante. Brevemente, foram preparadas duas soluções ajustadas para 100µL, uma contendo pDNA + DMEM sem SFB e antibiótico e outra contendo Lipofectamine™ 2000 + DMEM sem SFB e antibiótico. Após a junção das soluções e os repousos necessários para a formação dos complexos, foi pipetado 50µL por poço para um volume de transfecção final de 500µL. Igualmente à transfecção com PEI, a concentração final de pDNA por replicata foi de 4,0µg de pDNA:mL. O período de incubação foi de 5h.

1.3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR COLORAÇÃO COM AZUL DE TRIPAN

A viabilidade celular foi avaliada 48h após a transfecção. Para tanto, submeteram-se as células de cada poço à tripsinização por 5 min em estufa incubadora a 37°C, seguido de centrifugação por 5 min a 1200rpm e ressuspensão em 200µL de meio sem SFB. Em seguida, as células foram incubadas por 20 min em banho-maria a 37°C com mais 200 µL de solução de azul Tripán a 0,4% (de forma a obter-se a concentração de 0,2% no volume total da suspensão celular).

Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 min a 1800 rpm e lavadas em PBS até que o sedimento se tornasse claro. Para cada poço de cultivo, foram feitas três lâminas para visualização das células, avaliadas por visualização em luz branca em estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão), sendo fotografadas e contabilizadas as células totais e a proporção de células coradas de azul.

1.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GFP

A avaliação da fluorescência iniciou-se após 48h do início da transfecção. Seguindo-se à tripsinização, as células foram ressuspensas em 500µL e três lâminas por poço de cultivo foram confeccionadas e submetidas à visualização em luz branca e ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, filtro de 450-490nm), sendo fotografadas sistematicamente. O número de células totais e a proporção de células foram obtidos por contagem das estruturas nas fotos utilizando o Programa Image J (versão 1,45s, National Institute of Health, EUA). A expressão do GFP foi avaliada com 48h, 96, 192, 264 e 384h após o início da transfecção.

1.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As proporções de células viáveis e de células expressando o GFP foram comparadas entre os tratamentos por análise de variância (ANOVA) no programa Sistema de Análises Estatísticas (Statistical Analysis System – SAS, versão 9.0, Cary, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média.

3 RESULTADOS

A análise da expressão do GFP revelou uma maior ($P < 0,05$) proporção de células transfectadas com Lipofectamine™ 2000 ($8,76 \pm 1,48\%$) do que PEI ($2,66 \pm 0,65\%$) com 48h após transfecção (Figura 1), enquanto no grupo controle não ocorreu nenhuma célula fluorescente. A visualização das células em placa de cultivo após 48h de transfecção mostrou um aparente efeito dos agentes sobre a aderência celular ao fundo da placa de cultivo (Figura 2) em relação ao controle, com mais células em suspensão. A análise por coloração com Azul de Tripán confirmou a diminuição ($P < 0,05$) da taxa de células viáveis após transfecção com PEI ou Lipofectamine™ 2000 ($75,45 \pm 5,28\%$ e $85,35 \pm 1,89\%$, respectivamente) em relação ao controle ($97,32 \pm 0,26\%$). Contudo, não houve diferença ($P > 0,05$) entre PEI e Lipofectamine™ 2000 para o fator viabilidade.

Figura 1 - Morfologia de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* após 48h de transfeção.

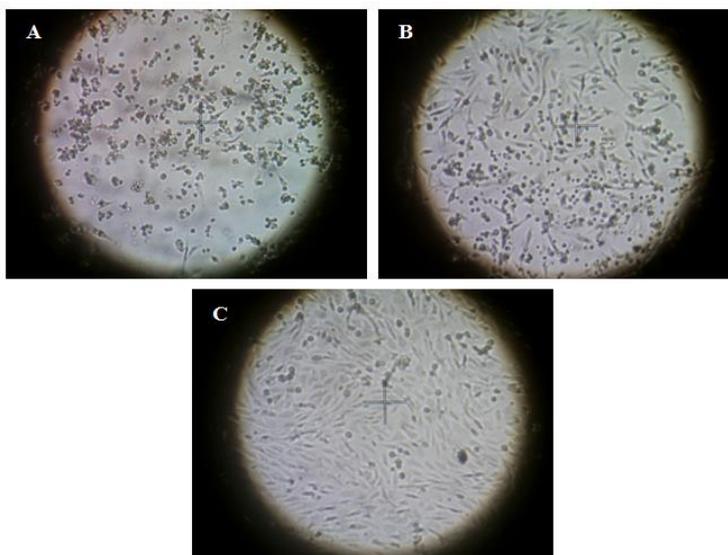
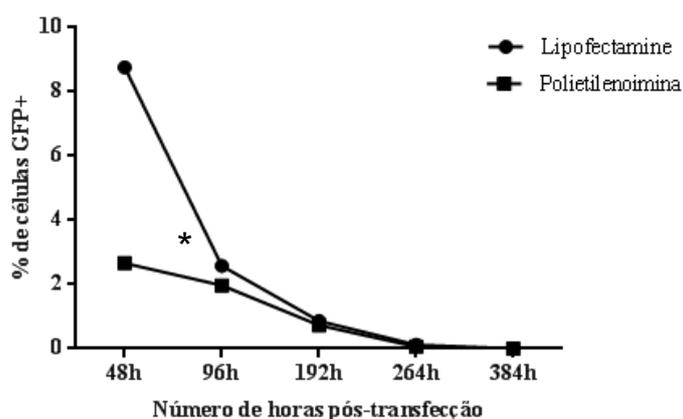


Figura 1: Nos tratamentos A e B, pode-se visualizar um número maior de células em suspensão, com formato circular e aspecto escurecido, indicativo de células em degeneração. A – Células transfectadas com PEI; B – Células transfectadas com Lipofectamine™ 2000; C – Controle. Microscópio Zeiss ICM405. Aumento: 100 x. **Fonte:** arquivo pessoal

Verificou-se uma queda rápida na taxa de fluorescência entre 48 e 96h pós-transfeção para o tratamento Lipofectamine™ 2000 e, a partir desse período, não houve diferença ($P>0,05$) nos períodos de 96, 192, 264 e 384h pós-transfeção entre PEI e Lipofectamine™ 2000 (Figura 2).

Figura 2 – Variação percentual de fibroblastos bovinos expressando a proteína fluorescente verde ao longo do cultivo pós-transfeção



* Os pontos marcados com asterisco apontam diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$). **Fonte:** arquivo pessoal

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos e padronizações que proporcionem boas taxas de transfecção e, principalmente, de integração do transgene ao genoma da célula doadora de núcleo é fundamental para a consolidação da TNCS na produção de AGM. O uso de lipossomos e polissomos tem sido apresentado como alternativas para transfecção celular (LISAUSKAS, 2008). No presente estudo observamos maior taxa de transfecção com 48h nas células expostas a Lipofectamine™ 2000 do que com PEI, porém sem diferença nas avaliações com períodos maiores. Ambos os agentes foram tóxicos para as células nas concentrações utilizadas para a transfecção.

A eficiência dos métodos de transfecção pode variar de acordo com a proporção de carreador em relação ao DNA (COLOSIMO et al., 2000) e confluência celular (OLIVEIRA et al., 2005). O tipo celular é também um fator importante para a eficiência da transfecção. Em estudo com células musculares de camundongos transfectadas com Lipofectamine™ Dodds et al. (1998), observaram máxima expressão de GFP (25,6%) com 18h pós-transfecção. Utilizando Lipofectamine™ para transfectar condrócitos articulares bovinos e humanos, Madry e Trippel (2000) obtiveram eficiência entre 0,3 e 1,2% após 48h de transfecção. Uchida et al. (2002) observaram taxas de transfecção de 30% com Lipofectamine PLUS em células HeLa, mas 9,3%, 1,2 e 0% em células endoteliais dos vasos umbilicais, fibroblastos da pele e hepatócitos humanos, respectivamente. Esses estudos mostram a grande variação que pode haver na eficiência da transfecção com agentes carreadores em diferentes tipos de células, o que torna difícil uma comparação da eficiência entre estudos.

A concentração de DNA também influencia a eficiência da transfecção. Em fibroblastos bovinos, Oliveira et al. (2005) obtiveram eficiência máxima de transfecção (acima de 40%) com Lipofectamine™ e 2,65 µg/mL de DNA, mas a eficiência foi próxima ou inferior a 10% com quantidade menores ou maiores de DNA. Em nosso estudo, a concentração de DNA por transfecção foi de 4µg/mL, o que pode ter limitado a transfecção com lipofectamine™ 2000.

De acordo com Yamano et al. (2010), PEI pode ser mais eficiente do que a Lipofectamine em alguns tipos celulares (linhagens comerciais humanas ou de camundongos), com efeito mínimo sobre a viabilidade. Em estudo com neurônios hipotalâmicos, Guerra-Crespo et al. (2003) observaram eficiência semelhante entre PEI e Lipofectamine™ 2000 (10,5 e 14,4%, respectivamente) em células aderentes após



observação em microscopia, e os efeitos sobre a viabilidade celular foram similares entre os agentes carreadores, variando de 83 a 99%. Apesar da eficiência da transfecção com Lipofectamine™ 2000 ter-se limitado a 8,76% no presente estudo, foi superior ao método de transfecção utilizando PEI nas 48h após a transfecção.

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. Em relação à transfecção com lipofectamine, em todas as linhagens a eficiência de transfecção ultrapassou os 50%. No entanto, quando PEI foi conjugado com microtúbulos de albumina, todas as linhagens responderam no mínimo ao mesmo nível de lipofectamine, sendo a eficiência de transfecção nas células HEK293T a maior do estudo (próxima a 80%). Os dados mostram a necessidade de maiores investigações sobre a associação de PEI a outros componentes que visem a aumentar a eficiência de transfecção.

A viabilidade celular pós-transfecção parece ser fortemente afetada pelo tipo de molécula carreadora e pelo tipo celular. Em trabalho realizado em cultivo *in vitro* de células endoteliais da córnea, Pleyer et al. (2001) verificaram correlação inversa entre a eficiência de transfecção e a viabilidade celular a partir do uso de DMRIE (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA); a viabilidade foi também dependente da concentração do lipídeo catiônico. Utilizando lipídeos DOPE/DOTAP 1:1 na transfecção de macrófagos, Romoren et al. (2004) observaram que a primeira concentração testada (20ug/mL) reduziu em 30 a 35% a viabilidade celular quando comparada ao controle; no entanto, na mesma concentração, células originadas de hepatoma (linhagem RTH-149) reduziram apenas em 5% a viabilidade, o que mostra que linhagens diferentes respondem diferentemente à exposição de moléculas carreadoras.

Em estudo realizado com fibroblastos fetais bovinos, Forcato et al. (2012) avaliaram os níveis de toxicidade de PEI 25kDa, identificando que, quando as células eram transfectadas com 2ug a 4ug de PEI por poço (placas de 24 poços), os índices de células viáveis caíram significativamente (54,7% e 18,5%, respectivamente), ao passo que 1ug por poço manteve a viabilidade celular em torno de 90% sem diferença estatística para eficiência de transfecção. Em nosso estudo a quantidade de 2uL de PEI utilizada por poço corresponde a aproximadamente 1,6µg, com viabilidade média de 75%.

As informações sugerem que é possível obter resultados de eficiência similares utilizando-se menores quantidades de PEI com menor prejuízo à viabilidade.

A partir da análise da Figura 2, nota-se uma queda rápida na taxa de fluorescência entre o 2º e o 4º dia para o tratamento Lipofectamine; a partir desse ponto, a redução acompanha o tratamento com PEI. Segundo Bressan (2008), embora as taxas por transfecção lipossomal possam ser elevadas, a maior parte da expressão é transiente, não havendo integração do gene de interesse ao material genético da célula hospedeira. Para que isso ocorra, o complexo deve romper as barreiras citoplasmáticas (endonucleases, enzimas lisossomais) e atingir o núcleo. Nesse aspecto, o efeito “esponja de elétrons” proposto para PEI poderia constituir uma vantagem, ao passo que o pDNA recebe proteção adicional contra a degradação. Há pelo menos um trabalho que buscou avaliar a possível interação do complexo com o ambiente lisossomal, que não foi verificada entre 2 e 5h de transfecção, tempo suficiente para que o complexo atinja o núcleo celular (GODBEY et al., 2000). Tem-se estudado constantemente o uso de PEI como um potencial vetor de relevância clínica (SHARMA et al., 2011), com evidências que suportam transferências gênicas de sucesso e expressão continuada do transgene. No entanto, essa característica não foi observada nas células do presente estudo.

Fatores limitantes para a continuidade da expressão do transgene nas células e a consequente construção de linhagens estáveis decorrem do fato de que a maior parte da expressão de genes exógenos usando vetores plasmidiais é transiente, isto é, o DNA é transcrito, mas não integrado ao material genético da célula. Apesar de acreditar-se que as regiões de maior integração do transgene sejam as de eucromatina, transgenes integrados próximos a regiões heterocromáticas podem ter sua expressão diminuída (LISAUSKAS, 2008). Além disso, para alguns tipos celulares ou linhagens, o promotor pode influenciar a permanência da expressão. Apesar de o promotor CMV ser altamente utilizado por levar a níveis mais elevados de expressão de proteínas exógenas, já foi demonstrada, por exemplo, uma diminuição posterior da expressão do transgene usando o promotor CMV em células-tronco humanas (XIA et al., 2007; LIU et al., 2009). Essa instabilidade parece ocorrer pelo menos para células indiferenciadas de mamíferos (KIM et al., 2007), sendo necessárias mais investigações para avaliar a consistência da expressão direcionada por CMV em fibroblastos bovinos.



5 CONCLUSÃO

A transfecção de fibroblastos bovinos com Lipofectamine é superior à Polietilenoimina, no entanto ocorre queda da fluorescência ao longo do cultivo até a sua total ausência no mesmo período para ambos os métodos. Nas condições testadas, a transfecção com ambos os métodos apresenta efeito negativo sobre a viabilidade de fibroblastos bovinos.

EFFECT OF THE USE OF LIPOFECTAMINE™ 2000 AND POLYETHYLENEIMINE (PEI) IN THE EXPRESSION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN IN TRANSFECTION FIBROBLASTS CATTLE CULTURED IN VITRO

ABSTRACT

The somatic cell nuclear transfer (SCNT) associated to transgenesis is a promising tool in the generation of cattle husbandry characteristics of interest, however the establishment of efficient transfection methods of donor cells and transgenic cell lines is still facing difficulties. The objective of this study was to evaluate the efficiency of carrier DNA Lipofectamine™ 2000 and Polyethyleneimine (PEI) in transfection of cultured bovine fibroblasts *in vitro* with plasmid vectors containing the transgene of green fluorescent protein (GFP). After incubation at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity, bovine fibroblasts at 80% confluence in culture medium without FBS and antibiotics were transfected with Lipofectamine™ 2000 or PEI for five hours. Cells were evaluated after 48, 96, 192, 264 and 384h post-transfection for expression of GFP in epi-fluorescent microscopy. Samples were trypsinized and assayed for viability (48h post transfection) by Trypan Blue staining in bright field microscopy. A group of cells without exposure to transfection agents was used as control. Results were analyzed by ANOVA. We found a higher proportion of positive cells in the GFP transfection with Lipofectamine (8.76±1.48%) compared to PEI (2.66±0.65%) after 48h. All treatments resulted in the total absence of fluorescence after 384h. There were differences (P<0,05) in viability between control and transfected cells, but not between the transfection methods. We conclude that, under the conditions tested, Lipofectamine™ 2000 is the most efficient, but after 384h total silencing the expression occurs.

KEYWORDS: Transgenic Animals. Nuclear Transfer. Transfection Methods.

REFERÊNCIAS

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

ARAT, S.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, S. J.; RESPESS, D. S.; TUMLIM, M.; STICE, S. L. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biology of Reproduction**, n.66, p.1768-1774, 2002.

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.

COLOSIMO, A.; GONCZ, K. K.; HOLMES, A. R.; KUNZEL-MANN, K.; NOVELLI, G.; MALONE, R. W.; BENNET, M. J.; GRUENERT, D. C. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. **Biotechniques**, v. 29, p. 314-331, 2000.

DANIELLS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulose cell nuclei. **Biology of Reproduction**, n. 63, p. 1034-1040, 2000.

DANG, S.; WANG, R.; QIN, M.; ZHANG, Y.; GU, Y.; WANG, M.; YANG, Q.; LI, X.; ZHANG, X. A novel transfection method for eukariotic cells using polyethilenimine coated albumin microbubbles. **Plasmid**, v. 66, p. 19-25, 2011.

DODDS, E.; DUNCKLEY, M. G.; NAUJOKS, K.; MICHAELIS, U.; DICKSON, G. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. **Gene Therapy**, v. 5, n. 4, p. 542-51, 1998.

FELGNER, P. L. ; GADEK, T. R. ; HOLM, M. ; ROMAN, R. ; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Biochemistry**, v. 84, p. 7413-7417, 1987.

FORCATO, D. O.; NICOTRA, M. F. O.; ORTEGA, N. M.; ALESSIO, A. P.; FILI, A. E.; RODRÍGUEZ, N.; BOSCH, P. 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

FUKUMOTO, Y.; OBATA, Y.; ISHIBASHI, K.; TAMURA, N.; KIKUCHI, I.; AOYAMA, K.; HATTORI, Y.; TSUDA, K.; NAKAYAMA, Y.; YAMAGUCHI, N. 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, 2010.

GODBEY, W. T.; BARRY, M. A.; SAGGAU, P.; WU, K. K.; MIKOS, A G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p. 321-328, 2000.

GUERRA-CRESPO, M.; CHARLI, J. L.; ROSALES-GARCÍA, V. H.; PEDRAZA-ALVA, G.; PÉREZ-MARTÍNEZ, L. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 127 , n. 2, p.179-92, 2003.

HOUDEBINE, L. M. The methods to generate animals and to control transgene expression. **Journal of Biotechnology**, n.98, p.145-160, 2002.

IGUMA, L. T.; LISIAUSKAS, S. F. C.; MELO, E. O.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; VIANNA, G. R.; SOUSA, R. V.; DODE, M. A. N.; ARAGAO, F. J. L.; RECH, E. L.; RUMPF, R. Development of bovine embryos reconstructed by nuclear transfer of transfected and non-transfected adult fibroblast cells. **Genetics and Molecular Research**, n. 4, v. 1, p.55-66, 2005.

KELLER, H.; YUNXU, C.; MARIT, G.; PLA, M.; REIFFERS, J.; THÈZE, J.; FROUSSARD, P. Transgene expression, but not gene delivery, is improved by adhesion-assisted lipofection of hematopoietic cells. **Gene therapy**, v. 6, n. 5, p. 931-938, 1999.

KIM, S.; KIM, G. J. ; MIYOSHI, H. ; MOON, S. ; AHN, S. E. ; LEE, J. H.; LEE, H. J.; CHA, K.; CHUNG, H. M. Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 4, p.537-545, 2007

KNUTSON, J. C.; YEE, D. Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. **Analytical Biochemistry**, v. 164, p.44-52, 1987.

KUNATH, K.; HARPE, A. V.; FISCHER, D.; KISSEL, T. 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, v. 14 2003.

LAIBLE, G.; BROPHY, B.; KNIGHTON, D.; WELLS, D. N. Compositional analysis of dairy products derived from clones and cloned transgenic cattle. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 166-177, 2007.

LISIAUSKAS, S. F. C. **Animais Transgênicos utilizados como Biorreatores**. 2008.124f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LIU, J.; JONES, K. L.; SUMER, H.; VERMA, P. J. Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. **Molecular Reproduction**, v. 76, n. 6, p. 580-586, 2009

LIU, J.; LUO, Y.; ZHENG, L.; LIU, Q.; YANG, Z.; WANG, Y.; SU, J.; QUAN, F.; ZHANG, Y. Establishment and characterization of fetal fibroblast cell lines for generating human lyzosome transgenic goats by somatic cell nuclear transfer. **Transgenic Research**, n. 22, p. 131-142 2013.

MADRY, H.; TRIPPEL, S. B. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. **Gene Therapy**, v. 7, n. 4, p. 286-91, 2000.

OLIVEIRA, A. C. **Desenvolvimento de complexos catiónicos lipossoma-DNA para terapia génica em osteoblastos**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Genética) - Universidade do Porto, PT, 2006.

- OLIVEIRA, R. R.; CARVALHO, D. M. D.; LISKAUSKAS, S. MELLO, E.; VIANNA, G. R.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. **Genetics and Molecular Research (GMR)**, v. 4, n. 2, p. 185-196, 2005.
- 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, 2006.
- PLEYER, U.; GROTH, D.; HINZ, B.; KEIL, O.; BERTELMANN, E.; RIECK, P.; RESZKA, R. Efficiency and toxicity of liposome-mediated gene transfer to corneal endothelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 73, p.1-7, 2001.
- ROMOREN, K.; THU, B. J.; BOLS, N. C.; EVENSEN, O. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1663, p. 127-34, 2004.
- SHARMA, A.; TANDON, A.; TOVEY, J. C. K.; GUPTA, R.; ROBERTSON, D.; FORTUNE, J. A.; KLIBANOV, A. M.; COWDEN, J. W.; RIEGER, F. G.; MORAN, R. R. 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, 2011.
- SUN, G.; LI, R.; DAI, Y.; WANG, H.; WANG, L.; LIU, W.; DING, F.; WEI, H.; LI, N. Apoptosis of transgenic cloned and recloned bovine blastocysts. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 7, p. 821-826, 2009.
- TOLEDO, J. R.; PRIETO, Y.; ORAMAS, N.; SÁNCHEZ, O. Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 3, p. 538-544, 2009.
- UCHIDA, E.; MIZUGUCHI, H.; ISHII-WATABE, A.; HAYAKAWA, T. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a widerange of human cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 7, p.891-7, 2002.
- WAGNER E.; CULMSEE, C.; BOECKLE, S. Targeting of Polyplexes: Toward Synthetic Virus Vector Systems. **Advances in Genetic**, v. 53, p. 333-354, 2005.
- WU, X.; OUYANG, H.; DUAN, B.; PANG, D.; ZHANG, L. ; YUAN, T. ; XUE, L.; NI, D.; CHENG, L. ; DONG, S. ; WEI, Z. ; LI, L.; YU, M.; SUN, Q.-Y.; CHEN, D.-Y.; LAI, L.; DAI, Y.; LI, G.-P. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. **Transgenic Research**, v. 21, p. 537-543, 2012.
- XIA, X.; ZHANG, Y. ; ZIETH, C. R.; ZHANG, S. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 1, p.167-176, 2007.
- 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, 2010.

YANG, P.; WANG, J.; GONG, G.; SUN, X.; ZHANG, R.; DU, Z.; LIU, Y.; LI, R.; DIND, F.; TANG, B.; DAI, Y.; LI, N. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for a large-scale production of functional human lactoferrin. **PLoS One**, v. 3, n. 10, 2008.

ZHONGHUA, L.; JUN, S.; ZHENKUN, W.; JIANGTIAN, T.; QINGRAN, K.; ZHONG, Z.; ZHI, Y.; LI, G.; HAIKUN, M.; SHUANG, S.; YUTIAN, L.; HONGBIN, W.; PRATHER, R. S. Green fluorescent protein (GFP) transgenic pig produced by somatic cell nuclear transfer. **Chinese Science Bulletin**, v.53, n. 7, p.1035-1039, 2008.