

**DIANA RANGEL DE LEMOS**

**TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR ESPERMATOZÓIDES  
BOVINOS ASSOCIADOS A VETORES LENTIVIRAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida  
Camargo

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L557t Lemos, Diana Rangel de, 1992-  
2020 Transferência gênica mediada por espermatozoides bovinos  
associados a vetores lentivirais / Diana Rangel de Lemos. –  
Viçosa, MG, 2020.  
57 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 48-57.

1. Sêmen. 2. Lentivírus. 3. Transferência de genes.  
4. Bovinos - Reprodução. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.20824

DIANA RANGEL DE LEMOS


**TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR ESPERMATOZÓIDES BOVINOS  
ASSOCIADOS A VETORES LENTIVIRAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

Assentimento:

  
Diana Rangel de Lemos  
Autora

  
Luiz Sérgio de Almeida Camargo  
OrientadorP

*Aos meus pais, Sergio Luiz Faria de  
Lemos (in memoriam) e  
Daisy Rangel de Lemos,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A jornada desses dois anos não foi nada fácil, entretanto, agradeço a todas as pessoas que tornaram essa caminhada um pouco mais fácil de ser percorrida. Primeiramente, à minha família. Durante esse período sofremos uma perda irreparável e inesperada. Uma saudade que bate em nossos corações todos os dias, mas que nosso amor e união nos manteve forte e possibilitou que continuássemos caminhando mesmo quando a gente não queria. Daisy e Lucas, vocês são os meus pilares, obrigada por todo o amor e apoio, esse trabalho só faz sentido hoje pois tenho vocês para compartilhar comigo essa conquista.

Agradeço a todos os meus amigos, pois sem os conselhos, apoio psicológico e emocional de vocês eu não estaria aqui hoje. Sou imensamente grata desde as amizades mais antigas que até hoje se fazem tão presentes, até as mais recentes. Ana Carolina, obrigada por todas as conversas sem parar até altas horas e por essa amizade tão leve e que posso sempre contar; Kenny e Aline, obrigada por sempre me escutarem, oferecerem um ombro e me aconselharem quando estou perdida; Moe and Jorge, thank you always for the good times, the laughter, and for always reminding me of how light life can be; Rayssa, minha parceira obrigada por sempre se preocupar comigo, mesmo tão longe eu sinto sua amizade sempre muito forte comigo e sou muito grata por ela; Bruna e Nine, obrigada pelas conversas, troca de experiências de vidas e por sempre se manterem presentes na minha vida. Da mesma forma também agradeço aos novos amigos feitos em Juiz de Fora: Elisa, obrigada por ter me acompanhado todos os dias nesses dois anos, além da casa dividimos também muitas risadas e momentos ótimos que vou guardar pra sempre comigo; Carol David, obrigada por desde o início ter sido tão carinhosa, atenciosa e acolhedora nessa cidade que era desconhecida pra mim, Vanessa, obrigada pelas trocas de experiências e por compartilhar os dias no laboratório com aqueles ovários e Judith, obrigada pela companhia sempre presente desde o início e por sempre ter estado tão próxima me alegrando com seu jeito especial de ser. De maneira geral, obrigada por terem feito dessa cidade um lar e o laboratório um lugar agradável de trabalhar. E também às amizades feitas em Viçosa: Ana Paula, Ana Karina e Carlos, obrigada por

sempre serem muito solícitos quando precisei e pela companhia quando estive na cidade.

Em especial gostaria de agradecer a duas pessoas por toda ajuda, suporte emocional e psicológico. Lilian e Gustavo, o apoio e amizade de vocês foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui. Gustavo, obrigada pelo convívio diário no laboratório, por toda a imensa ajuda nas técnicas, pelas ideias para o projeto e por ser meu super gêmeo. Lilian, obrigada por todos os conselhos, por não me deixar desistir incontáveis vezes e pela imensa ajuda para concluir este trabalho.

Ao meu orientador Luiz Sergio, agradeço pela oportunidade dada para que eu pudesse trabalhar com esse tema que tanto aprecio, em um projeto tão inovador e interessante. E pela tranquilidade e conhecimento passado para solucionar as questões críticas durante esse período.

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Animal, obrigada pelo apoio com as frases motivacionais de todo dia, Joel e Myro obrigada pelos incansáveis “agora vai” e por toda ajuda com os ovários. Carol, obrigada por ser sempre solícita quando precisei de ajuda. Naiara, muito obrigada por todos os conselhos, por toda a terapia e preocupação. Sou muito grata por todo o seu suporte psicológico e ajuda que foram essenciais nos meus momentos de desespero.

À secretária mais eficiente de um programa de pós-graduação. Rosi, durante esses dois anos você foi minha heroína e foi muito além das suas atividades para poder me ajudar. Se hoje estou aqui para concluir esse trabalho com todos os documentos entregues dentro do prazo, devo isso a você. Muito obrigada!

Agradeço também pela ajuda e paciência da Carol para finalizar a formatação desse trabalho

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, obrigada pela oportunidade de participar em um programa de grande renome e por todo apoio recebido durante esse período.

Ao apoio financeiro concedido pelo órgão de fomento, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) através da minha bolsa de estudos que garantiu minha dedicação integral ao programa de pós-graduação e

operacionalização dos estudos. E também à FAPEMIG, pelo financiamento deste projeto de pesquisa, tornando possível a produção deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Ao apoio da instituição Embrapa Gado de Leite, a qual ofereceu o suporte estrutural e técnico necessários para realização desse projeto.

A toda população brasileira a qual através dos seus impostos financiaram minha bolsa de estudos através do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa para realização dos meus estudos e pesquisa.

*Muito obrigada!*

*"Nolite te bastardes carborundorum"*

**Margaret Atwood**

## RESUMO

LEMOS, Diana Rangel de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Transferência gênica mediada por espermatozoides bovinos associados a vetores lentivirais.** Orientador: Luiz Sergio de Almeida Camargo.

Para otimização da produção de embriões bovinos geneticamente modificados (GMs) foi avaliada a possibilidade de produção *in vitro* (PIV) utilizando espermatozoides como carreadores de vetores lentivirais (VLs), visto que não consta na literatura relatos utilizando essa estratégia em bovinos. Foram avaliados a produção de embriões GMs com o transgene da proteína verde fluorescente (GFP) e posteriormente com o gene do fator IX de coagulação humano (FIX) como modelo de proteína recombinante humana (PRH), devido à importância desta proteína para pacientes com hemofilia B. Foi confirmada a expressão do GFP em células HEK e MDBK, após transdução das partículas, entretanto não foi possível realizar a seleção das células transduzidas. O mesmo resultado foi encontrado em fibroblastos transduzidos com o transgene FIX. A produção *in vitro* de embriões co-incubados com VLs durante a fertilização *in vitro* (FIV) prejudicou a taxa de clivagem e consequentemente a de produção de embriões. Já quando a co-incubação ocorreu durante o cultivo *in vitro* (CIV) não houve diferença estatística ( $p > 0.05$ ) nas taxas de desenvolvimento embrionário entre os tratamentos estudados. Apesar das células do cumulus terem expressado o GFP após incubação com os lentivírus, o mesmo não foi observado nos embriões. Esse resultado foi confirmado a partir da extração do DNA, que demonstrou ausência de inserção dos transgenes do GFP e FIX, o que diferiu de resultados encontrados em estudos similares. Dessa forma, os VLs estudados foram capazes de transfectar as células do cumulus, demonstrando sua eficiência na transdução de células somáticas, entretanto, não houve a produção de embriões geneticamente modificados a partir da co-incubação dos VLs com espermatozoides bovinos.

Palavras-chave: Espermatozoides. Vetores lentivirais. Transferência gênica. Proteínas recombinantes humanas

## ABSTRACT

LEMOS, Diana Rangel de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Genetic transfer mediated by bovine spermatozoa associated to lentiviral vectors.** Adviser: Luiz Sergio de Almeida Camargo.

To optimize the production of genetically modified bovine embryos (GMs), the possibility of in vitro production (IVP) using sperm as carriers of lentiviral vectors (LVs) was evaluated, since there are no reports in the literature using this strategy in cattle. The production of GM embryos with the fluorescent green protein transgene (GFP) and later with the human coagulation factor IX (FIX) gene as a model of human recombinant protein (PRH) was evaluated, due to the importance of this protein for patients with hemophilia B. The GFP expression in HEK and MDBK cells was confirmed after particle transduction, however it was not possible to select the transduced cells. The same result was found in fibroblasts transduced with the FIX transgene. The in vitro production of embryos co-incubated with VLs during in vitro fertilization (IVF) impaired the cleavage rate and consequently the embryo production. However, when the co-incubation happened during in vitro culture (IVC), no statistical difference ( $p>0.05$ ) was presented in the embryonic development rates between the studied treatments. Although cumulus cells expressed GFP after incubation with lentiviruses, the same was not observed in embryos. This result was confirmed by DNA extraction, which demonstrated the absence of GFP and FIX transgenes insertion, which differed from results found in similar studies. Hence, the studied VLs were able to transfect the cumulus cells, demonstrating their efficiency in the transduction of somatic cells, however, there was no production of genetically modified embryos from the co-incubation of the VLs with bovine sperm.

Keywords: Spermatozoa. Lentiviral vectors. Gene transfer. Human recombinant proteins

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanhos dos fragmentos de restrição e enzimas utilizadas para caracterização dos vetores utilizados na produção das partículas virais.....p. 34

Tabela 2. Primers construídos para a quantificação das partículas virais.....p. 35

Tabela 3. Efeito de co-incubação de vetores lentivirais durante a fertilização in vitro (FIV) no desenvolvimento embrionário.....p. 43

Tabela 4. Efeito da co-incubação de vetores lentivirais durante o cultivo in vitro (CIV) de zigotos presuntivos no desenvolvimento embrionário.....p. 43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagramas dos vetores lentivirais (pLWE2-FIX e pLenti6.3-FIX) construídos sobre o molde inicial do vetor de expressão pLenti-6.3p.....p. 31
- Figura 2. Mapa do plasmídeo recombinante pLWE2-FIX com o gene do fator IX de coagulação sanguínea humana dirigido pelo promotor  $\beta$ -caseína de cabra (software SnapGene Viwer 2.0.1).....p. 32
- Figura 3. Mapa do plasmídeo recombinante pLenti6.3-beta casein-FIX com o gene do fator IX de coagulação sanguínea humana dirigido pelo promotor  $\beta$ -caseína bovina (software SnapGene Viwer 2.0.1).....p. 33
- Figura 4. Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% dos fragmentos de restrição utilizados para caracterização dos vetores utilizados na produção das partículas virais.....p. 39
- Figura 5. Curva de amplificação referente à diluição seriada do plasmídeo pLWE2-FIX.....p. 40
- Figura 6. Curva padrão referente ao plasmídeo pLWE2-FIX.....p. 40
- Figura 7. Imagem de microscópio invertido com aumento de 10x de fibroblastos após seleção com antibiótico. A: Dia 4 (D4) de fibroblastos controle; A2: Dia 9 (D9) de fibroblastos controle; B: D4 de fibroblastos tratados com multiplicidade de infecção (MOI) de valor 5; B2: D9 de fibroblastos tratados com MOI de valor 5; C: D4 de fibroblastos tratados com MOI de valor 10; C2: D9 de fibroblastos tratados com MOI de valor 10.....p. 41
- Figura 8. Imagem de microscópio invertido com aumento de 20x de células transduzidas. 1A: Células MDBK sob luz fluorescente demonstrando expressão do GFP em algumas células; 1B: Células MDBK sob luz clara demonstrando morfologia das células; 2A: Células HEK sob luz fluorescente demonstrando expressão do GFP

em algumas células; 2B: Células HEK sob luz clara demonstrando morfologia das células.....p.42

Figura 9. Imagens de embriões e células cumulus no quarto e no oitavo dia após a fertilização do grupo FIV-GFP. Embriões clivados da fertilização in vitro com co-incubação com pLGW-GFP sob luz clara(A) e sob luz fluorescente (B), sem expressão de GFP. Células cumulus do mesmo grupo, sob iluminação clara (C) e sob luz fluorescente (D), mostrando expressão de GFP. Blastocistos oriundos de fertilização in vitro (FIV) com co-incubação com pLGW-GFP sob luz clara (E) e sob luz fluorescente (F), não mostrando expressão de GFP. Células cumulus do mesmo grupo, sob luz clara (G) e sob luz fluorescente (H), mostrando expressão de GFP. Aumento de 40x.....p. 44

Figura 10. Imagem de eletroforese em gel de agarose a 2% de fragmentos de PCR amplificados para o alvo do transgene GFP (A) ou Fator IX (B) das amostras de embriões e células do cumulus. FIV-GFP: fertilização in vitro com LV pLGW-GFP; CIV-GFP: cultivo in vitro com LV pLGW-GFP; FIV-FIX: fertilização in vitro com LV pLWE2-FIX; CIV-FIX: cultivo in vitro com LV pLWE2-FIX; NTC: no template control.....p. 45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 Transgenia em animais</b> .....	16
<b>2.2 Produção de proteínas recombinantes</b> .....	17
2.2.1 Animais Biorreatores .....	18
<b>2.3 Técnicas de produção de animais geneticamente modificados</b> .....	20
2.3.1 Microinjeção de construtos de DNA .....	20
2.3.2 Transferência de genes mediada por células tronco embrionárias .....	21
2.3.3 Transferência nuclear de célula doadora de núcleo .....	23
2.3.4 Edição gênica associada à endonucleases .....	24
2.3.5 Transferência gênica mediada por espermatozóides.....	26
2.3.6 Transferência gênica mediada por retrovirus.....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 Desenho dos vetores de expressão com o gene fator de coagulação humano IX</b> .....	31
<b>3.2 Amplificação, extração e purificação dos construtos de DNA</b> .....	33
<b>3.3 Cultura de células para empacotamento</b> .....	34
<b>3.4 Co-transfecção dos vetores virais</b> .....	34
<b>3.5 Concentração das partículas virais</b> .....	35
<b>3.6 Titulação das partículas virais por qRT-PCR</b> .....	35
<b>3.7 Produção de células transduzidas</b> .....	36
3.7.1 Transdução com a partícula viral pLWE2-FIX.....	36
3.7.2 Transdução com a partícula viral pLGW-eGFP.....	36
<b>3.8 Delineamento experimental</b> .....	37
<b>3.9 Produção de oócitos maturados para fertilização in vitro</b> .....	37
<b>3.10 Capacitação dos espermatozóides bovinos</b> .....	37

<b>3.11 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)</b> .....	38
<b>3.12 Cultivo embrionário <i>in vitro</i> (CIV)</b> .....	38
<b>3.13 Avaliação da expressão de GFP em embriões bovinos fertilizados <i>in vitro</i></b> .....	38
<b>3.14 Análise de PCR para detecção do gene FIX e GFP em embriões</b> .....	38
<b>3.15 Análise estatística</b> .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	39
<b>4.1 Amplificação, extração e purificação dos construtos de DNA</b> .....	39
<b>4.2 Titulação das partículas virais por qRT PCR</b> .....	40
<b>4.3 Produção de células HEK, MDBK e Fibroblastos transduzidos</b> .....	41
4.3.1 Transdução com a partícula viral pLWE2-FIX.....	41
4.3.2 Transdução com a partícula viral pLGW-eGFP.....	42
<b>4.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões</b> .....	42
4.4.1 Embriões produzidos para expressão do GFP.....	43
<b>4.5 Análise de PCR para detecção dos genes GFP e FIX em embriões e células do cumulus</b> .....	44
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

O advento das técnicas de transgenia em animais ocorreu em 1980 e 1981 com os trabalhos de Gordon e Ruddle, nos quais foram produzidos embriões murinos geneticamente modificados. Atualmente, a tecnologia da transgenia aplicada a animais tem como objetivo a produção de organismos que permitam: modelar a patogênese e comportamento de doenças de interesse (Volobueva et al., 2019); estudar eventos celulares e moleculares (por exemplo, regulação gênica) (Nie et al., 2019); melhorar a produtividade de animais de interesse pecuário (Proudfoot et al., 2019); produção de órgãos para transplante em humanos (Reardon, 2015; Niemann e Petersen, 2016); produzir proteínas recombinantes de alta qualidade para fins biotecnológicos e medicinais (Hunter, 2019).

Dentre as aplicações citadas acima, a produção de proteínas recombinantes humanas (PRHs) tem-se destacado devido à crescente demanda para fins terapêuticos (Bertolini et al., 2016), cuja produção veio como tecnologia capaz de suprir a demanda de medicamentos de origem humana utilizados largamente na medicina (Mitragotri et al., 2014). Tradicionalmente, há cinco meios distintos para a produção de PRHs, como: a expressão em bactérias geneticamente modificadas (GMs); expressão em fungos GMs; expressão em plantas GMs; expressão em células de mamíferos GMs; expressão em animais GMs (Ma et al., 2003; Merlin et al., 2014).

Entretanto, apesar de consideráveis vantagens relacionadas à produção dessas proteínas em bactérias, fungos e plantas, o produto final ainda era consideravelmente diferente em estrutura e atividade em relação à de origem humana (Ma et al., 2003; Merlin et al., 2014; Gecchele et al., 2015). Como alternativa, também pode ser realizado a produção de proteínas a partir do cultivo de células mamíferas GMs e da utilização de animais GMs como biorreatores (Hunter, 2019).

Atualmente, a produção de animais GM pode ser realizada através de diversas metodologias, como através da microinjeção de construtos de DNA na fase de pró-núcleo; edição gênica para deleção ou inserção de sequências; transferência nuclear a partir de células previamente geneticamente modificadas, as quais apresentam baixas taxas de eficiência, como 25% (Chereneck et al., 2005), 5,31% (Huang et al., 2014) e 28,4% (Monzani et al., 2013), respectivamente. Entretanto, o sistema de transdução através de retro/lentivírus apresentou resultados com melhores taxas de

produção de animais transgênicos em diversas espécies, como de 83% e 76,4% em embriões bovinos (Hofman et al., 2004; Otero et al., 2018); 52% em cordeiros (Lillico et al., 2011), e 42% em camundongos (Chandrashekran et al. 2014).

Dentro desse contexto os VLs destacaram-se pela maior eficiência na taxa de modificação gênica e produção de animais transgênicos. Essa vantagem associa-se à sua relação evolutiva próxima às células de mamíferos, garantindo características particulares, como a capacidade de integração genômica em células em parada mitótica, se tornando assim, uma ferramenta de grande potencial para aplicação biotecnológica para produzir as alterações genômicas de interesse (Durand, 2011).

Em 2012 houve evidência da interação dos espermatozóides com partículas lentivirais utilizadas para transgenia em suínos (Zhang et al., 2012), sugerindo assim a possibilidade de uso também na espécie bovina, como uma maneira de contornar as dificuldades relacionadas à eficiência na produção de animais GMs e os custos envolvidos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Transgenia em animais**

A abordagem da transgenia em animais envolve diversos tipos de tecnologias direcionadas para a produção de organismos geneticamente modificados. Esse foco de produção se deu a partir dos estudos de Gordon et al. (1980); Gordon e Ruddle (1981), os quais desenvolveram modelos de estudo transgênico em camundongos, que foram posteriormente realizados também em outras espécies.

A aplicação da tecnologia da modificação genética dos animais pode ser usada na pesquisa médica para criar modelos da doença humana. Esses modelos ajudam a identificar as vias da doença, assim como permitem a avaliação de novas terapias (Volobueva et al., 2019). A análise da função gênica é uma área que a utilização de animais geneticamente modificados é susceptível a aumentar significativamente, porque modificando um gene, suas várias funções em diferentes sistemas funcionais do corpo podem ser identificadas, fornecendo assim informações valiosas para aprofundar o entendimento do desenvolvimento biológico. Além disso, os animais transgênicos também podem ser utilizados na produção de proteínas de cunho terapêutico, assim como para a produção de xenotransplantes. Na agricultura, os

animais estão sendo desenvolvidos principalmente para produzir animais resistentes a doenças, produzir alterações desejáveis para as taxas de crescimento ou taxa de conversão alimentar, fazer carne mais magra, e melhorar as propriedades antimicrobianas do leite para animais recém-nascidos (Niemann e Kues, 2007).

## **2.2 Produção de proteínas recombinantes**

Dentre as aplicações citadas, a produção de proteínas recombinantes humanas (PRHs) tem-se destacado devido à crescente demanda para fins terapêuticos (Manesh et al., 2014), cuja produção em animais traz consideráveis vantagens. Nos últimos 20 anos houve um aumento considerável da parcela do mercado farmacêutico tomada por PRHs, também chamados de biofármacos (Bertolini et al., 2016; Picanco-Castro et al., 2013). O mercado global de biofármacos no ano de 2007 foi reportado como correspondendo a 86,8 bilhões de dólares, com expectativa de uma taxa de crescimento de 10,9% anuais, chegando a US\$160,1 bilhões em 2013 (Brock, 2019). Em relatório emitido pela agência Research and Markets em 2015, a previsão desse mercado para 2020 superou as expectativas anteriores, chegando a US\$306 bilhões (LDT. R. Biopharmaceuticals, 2019). Tal relevância para a indústria farmacêutica é indicativa da grande demanda dessa classe de medicamentos e, portanto, da também grande demanda de desenvolvimento de métodos alternativos para a produção desses insumos. Até o presente momento, ainda é notável a insipiência da indústria brasileira nesse setor, que corresponde a uma parcela muito pequena desse mercado (Mota, 2014).

A produção de PRHs apresentou-se como tecnologia capaz de suprir a demanda de medicamentos de origem humana utilizados largamente na medicina (Mitragotri et al., 2014). Anteriormente à introdução das PRHs, havia problemas na produção desses insumos em grande escala, ou total impossibilidade de sua disponibilização, uma vez que eram purificados, principalmente, a partir de sangue humano. Ademais, esse método de obtenção gerava grandes preocupações no que dizia respeito à segurança dos recipientes dessas proteínas e acabou por tornar-se forma relevante de disseminação de doenças transmitidas (Tenenbaum et al., 2005).

Um exemplo disso ocorreu com a transmissão de prions para inúmeros pacientes a partir da extração do hormônio de crescimento humano, que era extraído a partir da hipófise humana (Houdebine, 2018). Dentre as metodologias empregadas

na produção de proteínas recombinantes humanas pode-se citar: a utilização de bactérias, fungos, plantas, células de mamíferos ou animais geneticamente modificados (Hunter, 2019; Merlin et al., 2014).

Levando-se em consideração apenas aspectos básicos da genética e biotecnologia, seria esperado que a tradução de quaisquer PRHs em quaisquer organismos gerasse como produto proteínas exatamente iguais e de atividade idêntica a original, uma vez que a sequência de material genético recombinante é a mesma. Entretanto, apesar de consideráveis vantagens relacionadas à produção dessas proteínas em bactérias e fungos, a não homologia das vias de modificações pós-traducionais entre humanos e esses organismos torna o produto final da tradução proteica consideravelmente diferente em estrutura e atividade (Ma et al., 2003; Merlin et al., 2014; Gecchele et al., 2015). Isso foi observado com a alfa 1-antitripsina humana recombinante que em condições *in vitro* era ativa, porém quando injetada em pacientes tornava-se inativa. A partir disso, foi demonstrado que a proteína produzida por bactérias possuía metade da meia-vida, quando comparada com a molécula extraída do sangue que apresentava uma meia-vida mais duradoura e era bioativa, devido a sua glicosilação (Houdebine, 2018). Apesar da complexa maquinaria celular das plantas, proteínas produzidas por esses organismos ainda permanecem com pequenas diferenças em relação à humana (Hunter, 2019). Essas modificações pós-traducionais em sua maioria ocorrem depois dos ribossomos terem traduzido a informação genética, contida no RNA mensageiro, em cadeias polipeptídicas que então originam uma proteína, e essas modificações são essenciais para a produção de proteínas recombinantes bioativas (Houdebine, 2018).

Temos então como alternativa para a produção de proteínas idênticas às nativas, o cultivo de células mamíferas GMs e a utilização de animais GMs como biorreatores (Ma et al., 2003; Merlin et al., 2014).

### 2.2.1 Animais Biorreatores

O primeiro sistema de produção de proteínas recombinantes foram as bactérias, no início da década de 80, através da transferência gênica, de um promotor ativo em bactérias e da região codificante do gene da insulina humana, para bactérias, o que levou à produção comercial da insulina humana que foi inicialmente

comercializada em 1982. Leveduras são outros microorganismos caracterizados pela sua alta capacidade de produção de proteínas e enovelamento de maneira apropriada, entretanto, algumas delas não são capazes de realizar a glicosilação, enquanto outras conseguem de uma maneira não compatível com a encontrada em humanos. Deste modo, o sistema mais frequentemente utilizado são células de mamíferos geneticamente modificadas, como por exemplo as células Chinese Hamster Ovary (CHO) (Houdebine, 2018), e também o emprego de animais geneticamente modificados como biorreatores.

No mercado europeu e norte-americano existem ao menos duas PRHs produzidas por meio de animais GMs. A primeira a ser aprovada foi a Atryn®, antitrombina humana produzida em cabras pela antiga GTC Biotherapeutics, atualmente renomeada RevoBiologics após aquisição pela LFB Biotechnologies S.A.S., e que foi estimado que possa alcançar um mercado anual de U\$40-50 milhões nos Estados Unidos da América (Echelard et al., 2005). No Brasil foi gerado na Universidade Estadual do Ceará (UECE) cabra transgênica que secreta no leite o fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF), porém ainda sem produção comercial (Freitas et al., 2007). Em ambos os casos, os animais secretam o produto final através do leite, que foi determinado como uma fonte de fluido de proteínas ideal, assim como a clara do ovo no caso de galinhas. O sangue, por sua vez teve sua aplicação em desuso pelo fato de que nem todas as proteínas podem ser encontradas em altas concentrações no sangue, apenas as proteínas estáveis com meia-vida mais duradoura. Além disso, a presença dessas proteínas recombinantes no sangue poderia interferir com o metabolismo dos animais (Houdebine, 2018).

Algumas das metodologias mais empregadas para produção de animais geneticamente modificados consistem da microinjeção de construtos de DNA na fase de pró-núcleo, transferência gênica mediada por células tronco embrionárias, a transferência gênica mediada por retrovírus, edição gênica através de nucleases e transferência nuclear a partir de células previamente modificadas por uma das técnicas citadas. Apesar das consideráveis diferenças conceituais e técnicas entre as ferramentas apresentadas, invariavelmente, a produção de animais GMs ainda esbarra nas baixas taxas de sucesso da produção de embriões GMs e dos animais em si (Melo et al., 2007). Além disso, a implementação de tais técnicas exige um alto

custo inicial e operacional e grande habilidade técnica (Melo et al., 2007), como por exemplo no processo de purificação das proteínas, o que reduz a aparente vantagem de produção em animais transgênicos. (Houdebine, 2018).

## **2.3 Técnicas de produção de animais geneticamente modificados**

### **2.3.1 Microinjeção de construtos de DNA**

A microinjeção é uma técnica que foi primeiramente desenvolvida para isolar células bacterianas em 1902 pelo bacteriologista Dr. Marshall Barber, o qual aspirou células bacterianas e as injetou em várias células vegetais e protozoários para estudar os efeitos de microorganismos implantados na viabilidade dos organismos infectados (Xu, 2019).

A partir do estabelecimento da técnica, a mesma foi, ao longo do tempo, sendo utilizada para diversos tipos de aplicações biotecnológicas, como, injeção de proteína, RNA e com o desenvolvimento do DNA recombinante, também o DNA. (Xu, 2019).

A utilização da técnica para produção de animais transgênicos foi inicialmente demonstrada através da microinjeção direta de construtos de DNA dentro do pró-núcleo de um oócito fertilizado (Gordon et al., 1980).

O desenvolvimento da técnica envolve um processo na qual construtos de material genético de interesse, da mesma espécie ou não, deve ser transportado do meio extracelular até dentro do núcleo para que a informação possa se integrar com o genoma do organismo em questão (Chereneck, 2017). Esses construtos geralmente são baseados na utilização de plasmídeos, na qual um gene ou um cDNA de interesse são colocados sob controle de um gene heterólogo promotor, que será responsável pela expressão do transgene.

A inserção do material no genoma de interesse ocorre de maneira não direcionada, ou seja, aleatória. Isso pode acarretar em algumas situações que o gene seja inserido em um local em que não será expresso ou então pode vir a alterar algumas vias fisiológicas do animal (Kumar e Ratwan, 2016).

A partir da microinjeção, o desenvolvimento do embrião é realizada *in vitro* até a fase de blastocisto, na qual os embriões são selecionados e transferidos para um animal receptor que dará origem a um possível animal geneticamente modificado (Chereneck, 2017). Esse animal então é considerado um hemizigoto, visto que o DNA

exógeno estará presente em apenas um dos cromossomos, não havendo um alelo correspondente no cromossomo homólogo.

Dentro desse contexto, pode-se apontar dentre as vantagens da microinjeção pró-nuclear a possibilidade de aplicar a técnica a uma vasta quantidade de espécies, como camundongos (Pu et al., 2019), coelhos (Chereneck, 2017) e vacas (Yum et al., 2016), de modo que genes exógenos possam ser expressos de maneira eficiente. Além disso, a mesma é menos custosa quando comparada a outras técnicas para este mesmo fim e não possui um limite ao certo em relação ao tamanho do inserto de DNA a ser utilizado na técnica, porém sabe-se que fragmentos maiores integram em menor quantidade de cópias (Kumar e Ratwan, 2016).

Apesar disso, dentre as limitações da técnica pode-se citar o seu emprego limitado apenas à fase inicial embrionária, envolvendo excessiva manipulação das estruturas e um visível aumento no volume do pró-núcleo (Chereneck, 2017). Além das influências negativas que o construto gênico possa vir a desenvolver tanto no desenvolvimento embrionário quanto nos parâmetros fisiológicos do animal, dependendo do local de integração, que ocorre de maneira aleatória. Em relação à inserção, a mesma pode ser situada em um local que não permita sua expressão gênica, assim como pode ser integrada à diversas regiões do genoma o que resulta em padrões variáveis de expressão (Kumar e Ratwan, 2016).

A técnica de microinjeção pró-nuclear é uma técnica amplamente aceita no meio científico, favorecida pela sua simplicidade de transferir conteúdos de micromoléculas para macromoléculas. Pode haver algumas variações relativas à instrumentação utilizada e manipulação, mas ainda com taxas satisfatórias de sucesso. Desde a sua criação a técnica colaborou na evolução de vários estudos e abordagens, como de transgenia, expressão gênica e clonagem animal. As perspectivas futuras demonstram a maior associação de outras abordagens com a microinjeção, como por exemplo, associadas ao sistema edição gênica guiada por RNA, e o desenvolvimento de nanomanipuladores operados por inteligência artificial (Xu, 2019).

### 2.3.2 Transferência de genes mediada por células tronco embrionárias

Esse procedimento teve início em torno de 1981, quando foram isoladas com sucesso células tronco embrionárias a partir de blastocistos murinos (Evans e

Kaufmann, 1981; Martin, 1981). A partir deste feito, a técnica de microinjeção foi utilizada para inserir sequências de interesse de DNA no genoma das células tronco através de recombinação homóloga. E com a reinserção dessas células nos blastocistos, foi possível obter o desenvolvimento de embriões quimeras (Du et al., 2019).

O animal quimera é caracterizado por possuir em seu corpo duas linhagens de células geneticamente distintas entre si (Levine e Grabel, 2017). A partir desses animais quimeras da geração F1, ocorrem cruzamentos direcionados para que haja a formação de um animal transgênico, ou seja, a modificação genética estará presente em todo o genoma do animal (Mehta e Sharma., 2017).

A técnica possui maior impacto no estudo de controle gênico em processos de desenvolvimento, pois através da recombinação homóloga é possível direcionar a análise para um gene específico, também chamado de *gene targeting* (Kumar e Ratwan, 2016). Essa análise pode ser avaliada por duas metodologias: o gene *knockout*, que consiste em tornar um locus específico não funcional através da inserção de uma sequência de DNA irrelevante, ou da deleção de uma sequência, de modo que impeçam a expressão do locus específico. E o *gene knockin*, que envolve a substituição de uma sequência de DNA ou adição de uma sequência que não constitui o locus em questão (Doyle, 2012).

Portanto, entre as vantagens encontradas na utilização de células tronco embrionárias encontra-se a possibilidade de seleção apenas das células em que houve a integração correta do transgene, através do uso de marcadores, garantindo assim a produção de um embrião com o transgene de interesse. O que demonstra uma vantagem em relação ao método de injeção pró-nuclear visto que nessa técnica a integração do transgene apenas poderia ser constatada no animal transgênico (Mehta e Sharma, 2017).

Além disso, as células tronco embrionárias demonstram uma maior eficiência no processo de recombinação homóloga quando comparadas ao restante das células, o que facilita a sua aplicação no processo (Kumar e Ratwan, 2016).

Ademais, a recombinação homóloga permite a integração precisa do transgene em um local específico (Wakchaure et al., 2015), o que difere da integração em local aleatório enfrentada pela injeção pró-nuclear, sendo possível assim, a formação de animais *knockouts*, importantes para o entendimento de função gênica

Em contrapartida, a metodologia de células tronco embrionárias com fins de transgenia apresenta a limitação de ser aplicada principalmente em camundongos, devido ao fato de ser difícil o isolamento e manutenção das células, no caso de animais domésticos de grande porte, e também o maior intervalo de geração e o alto custo para manter animais quimeras é considerado um obstáculo para aplicação da técnica com esses animais (Mehta e Sharma, 2017).

### 2.3.3 Transferência nuclear de célula doadora de núcleo

A técnica teve seu grande destaque em animais domésticos com o trabalho de Wilmut et al. (1997) com o nascimento da ovelha Dolly, primeiro animal clonado a partir de células da glândula mamária de um animal adulto. Esse resultado permitiu então a abertura de novas possibilidades atrativas para a transgenia animal (Collares et al., 2005).

Para o desenvolvimento da técnica é necessário a princípio a coleta de células somáticas do animal que será clonado. As células de escolha podem variar entre diversos tecidos e de animais de idade variável (Mishra et al., 2018). A partir disso, as células podem ser cultivadas e selecionadas *in vitro* de acordo com a presença da manipulação genética desejada e, desse modo, garantir que o transgene de interesse esteja presente e seja transmitido no animal gerado (Bressan et al., 2013).

Outro ponto da técnica inclui a utilização de um oócito parado em metáfase II, visto que os componentes críticos necessários para início e direcionamento do desenvolvimento embrionário inicial estão presentes nessa estrutura. Com isso então é realizado a etapa de enucleação que consiste da retirada do material genético desse oócito (Edwards et al, 2003).

A etapa seguinte à enucleação, conhecida como reconstrução, envolve a inserção da célula doadora de núcleo no espaço perivitelínico, de modo que a membrana da célula esteja em contato com a membrana do citoplasma (Mishra et al., 2018). Esse complexo então tem por objetivo a formação de um embrião de uma célula, processo que muitas vezes é obtido através da administração de pulsos elétricos para permitir a fusão das membranas. Em alguns casos, esse pulso elétrico também já é suficiente para ativar o início do desenvolvimento embrionário, enquanto em outros, é necessário a adição de outros compostos químicos para estimular o início do desenvolvimento (Edwards et al., 2003). Após cultivo desses embriões

reconstruídos, os mesmos são transferidos para uma fêmea receptora, que será responsável pela gestação desses animais até o nascimento.

Apesar da técnica apresentar uma baixa eficiência na produção de animais, a maioria dos animais produzidos são transgênicos, evitando a ocorrência de mosaicismos, o que faz dessa tecnologia muito mais eficiente que a injeção pró-nuclear (Bressan et al., 2013). Portanto, a associação de técnicas de modificação genética com a de transferência de célula doadora de núcleo permitiu um aumento na produção de animais geneticamente modificados, e esta associação já garantiu o desenvolvimento de animais biorreatores para produção de proteínas recombinantes (Baguisi et al., 1999; Monzani et al., 2013) e para animais resistentes a doenças, como por exemplo, nascimento de bovinos resistentes à encefalopatia espongiforme bovina (Wongsrikeao et al., 2011).

#### 2.3.4 Edição gênica associada à endonucleases

Essa tecnologia foi inicialmente desenvolvida em estudos que demonstravam que sítios de reconhecimento de meganucleases poderiam ser utilizados para induzir quebras em dupla fita (DSB) em locais específicos e assim serem utilizados para controlar a recombinação (Wright et al., 2014). Após isso, novas técnicas também foram desenvolvidas, utilizando nucleases direcionadas por proteínas sítio-específicas de forma a permitir a edição gênica.

Entre as primeiras metodologias desenvolvidas pode-se citar o estabelecimento da *zinc finger nuclease* (ZFN). Uma molécula simples de *zinc finger* é capaz de reconhecer três bases consecutivas de DNA e pode ter uma interação cruzada com uma quarta base. A molécula híbrida é elaborada a partir de arranjos de *zinc finger* que podem reconhecer até dezoito bases consecutivas e junto a isso ocorre a associação com a nuclease FokI (Wright et al., 2014), o que permite certa especificidade na indução e quebra da dupla fita de DNA.

A partir da quebra em dupla fita, o sistema de reparação celular pode gerar uma união não homóloga que gera inserções ou deleções curtas ou uma recombinação homóloga quando há uma fita homóloga disponível (Remy et al., 2010).

Através da aplicação da ZFN foi possível induzir a deleção de sequências no gene da miostatina em fibroblastos e embriões suínos (Huang et al., 2014) e em

fibroblastos bovinos para clonagem (Luo et al., 2014), porém, não foi avaliada a viabilidade ao nascimento.

Apesar do sucesso, a técnica enfrenta problemas de implementação, devido a desafios com a toxicidade, edição *off-target* (fora do alvo), escolha limitada de alvos e dificuldades no design da nuclease, o que fez com que essa técnica fosse substituída por outras (Wright et al., 2014).

Posterior ao desenvolvimento das ZFN, outra possibilidade de edição gênica foi elaborada, conhecida como TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*). Esse sistema foi originado da família do tipo III de proteínas efetoras da espécie *Xanthomonas* spp., um grupo de patógenos vegetais bacterianos gram-negativos (Wright et al., 2014). A molécula possui um domínio de ligação à endonuclease FokI, que é ativa apenas como dímero, portanto pares de TALENs devem ser desenhados para posicionar o domínio da nuclease FokI no local alvo de edição gênica onde então ocorre a quebra em dupla fita, isso garante, portanto, a maior especificidade dessa técnica (Boettcher e McManus, 2015).

Essa técnica tem se demonstrado como uma ferramenta promissora na utilização em terapia gênica, e de fato, já foram reportados alguns trabalhos demonstrando o seu potencial uso na terapia de algumas doenças hematopoiéticas (Quintana-bustamante et al., 2019). Além disso, a técnica também se demonstrou eficiente na produção de embriões caprinos knockout para o gene da miostatina (MSTN), responsável por regular negativamente a proliferação e diferenciação da célula muscular esquelética (Zhang et al., 2018). E também para a produção de suínos geneticamente modificados no locus B2m através da injeção de mRNA das TALENs. Esses animais contendo as modificações produziram então suínos com produção nula da proteína B2M e, com isso, não possuíam o complexo principal de histocompatibilidade I (MHCI) na superfície celular dos seus linfócitos. Esses animais deficientes de MHC1, portanto, podem ser utilizados como doadores para investigar os efeitos de xenotransplantes e também apresentar um modelo não-roedor para analisar a regulação dos receptores de MHCI (Wang et al., 2016).

Outra possibilidade de edição gênica também foi desenvolvida com o sistema Crispr (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) - Cas9 que consiste de um complexo formado pelo Crispr-RNA (crRNA) de ativação em trans (tracrRNA), que se liga à nucleasse Cas9 e o crRNA, que define a sequência alvo

específica, através do pareamento de bases. O complexo crRNA-tracrRNA é definido como o RNA guia (gRNA), que alternativamente pode também ser produzido *in vitro* como uma molécula simples de RNA (sgRNA). A interação gerada entre o RNA guia e a sequência gênica complementar ativa o recrutamento da Cas9 no local específico, levando assim a quebra em dupla fita como nos sistemas anteriores (Klimke et al., 2019).

O sistema Crispr-Cas9 demonstrou aplicabilidade a uma grande variedade de animais, desde metazoários até primatas, e a eficiência e simplicidade do sistema diminuiu o tempo utilizado e o custo o que permitiu uma maior abertura para as modificações genéticas em animais. Entre algumas aplicações pode-se citar a entrega do sistema Crispr-Cas9 em modelos de camundongos que possuíam a distrofia muscular de Duchenne e através dessa modificação genética foi possível reestabelecer a expressão correta de distrofina e parcialmente recuperar a funcionalidade dos músculos afetados (Tabebordbar et al., 2015).

Portanto, ambos os sistemas de edição gênica TALENs e o Crispr-Cas9 demonstram grande potencial em relação a sua eficácia na modificação genética, entretanto um estudo constatou que a produção de embriões na fase de oito células teve maior taxa quando usado o sistema de TALENs, mas por sua vez o sistema Crispr-Cas9 apresentou melhor taxa de edição. Já quando avaliado quanto às edições fora do alvo (*off-target*), o sistema TALENs teve melhor performance que a Crispr-Cas9, o que pode ser justificado pela necessidade do duplo reconhecimento de sequências para dimerização da nuclease (Zhang et al., 2018).

### 2.3.5 Transferência gênica mediada por espermatozoides

A técnica é baseada na capacidade dos espermatozoides de se associar e internalizar DNA exógeno e transferir ao oócitos durante a fertilização (Kumar et al., 2017). A utilização da transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT) é considerada uma ferramenta biotecnológica simples, rápida e econômica para a produção de embriões geneticamente modificados. Entretanto, a eficiência dessa técnica permanece baixa devido à baixa associação do DNA exógeno com o espermatozoide (Sánchez-Villalba et al., 2018).

A aplicação da SMGT foi primeiramente demonstrada com a produção de camundongos transgênicos através do trabalho de Lavitrano et al. (1989), e desde

então, a técnica tem sido relatada com aplicação em diversas espécies, como caprinos (Kumar Pramod et al., 2015), suínos (Bacci et al., 2009), camundongos (Wang et al., 2017) e bovinos (Arias et al., 2016), o que sugere que o mecanismo fisiológico de captação desse material exógeno seja conservado dentre as espécies (Cavalcanti et al., 2016).

A interação dos espermatozoides com o DNA é mediada através de proteínas ligantes ao DNA (DBP), que estão presentes na superfície celular. A formação do complexo DNA exógeno/DBP é dependente da expressão de MHC classe II que sinaliza para a internalização do complexo mediada por CD4 (Lavitrano et al., 2020).

Diversas metodologias foram desenvolvidas de modo a melhorar a eficiência da SMGT, como associar a utilização de eletroporação, como feito no estudo de Cavalcanti et al., (2016), entretanto não houve diferença significativa entre o tratamento da eletroporação e o de incubação com DNA em relação à taxa de blastocistos. Já no estudo realizado por Simões et al., (2012) foi avaliado o desempenho da técnica com a associação de lipofecção, entretanto o tratamento não apresentou diferença em relação às taxas de clivagem, blastocisto e de embriões geneticamente modificados. Além disso, existem relatos de outras técnicas que também já foram associadas, como a inserção mediada por enzima de restrição (REMI), utilização da enzima recombinase A e a utilização de uma proteína de ligação para a transferência gênica (Arias et al., 2016).

A partir do estudo realizado por Zhang et al., (2012) foi demonstrado a afinidade de VLs por espermatozoides suínos, confirmando essa interação através de microscopia eletrônica após incubação das partículas virais com espermatozóides. Deste modo, passou a ser avaliada a capacidade dos espermatozóides de carrear os VLs e, deste modo, mediar a produção de embriões geneticamente modificados.

### 2.3.6 Transferência gênica mediada por retrovírus

Uma década após identificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como sendo o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), estudos demonstraram o potencial dos lentivírus de serem otimizados para utilização na terapia gênica. Estudos foram realizados em relação à possibilidade de utilizar os lentivírus para infectar células específicas e quanto à função desenvolvida pelas proteínas do HIV durante a infecção e replicação, principalmente na dinâmica

estabelecida para importar o pró-vírus para o núcleo da célula hospedeira (Naldini et al., 2016).

A partir disso, foram então desenvolvidos dois sistemas de vetores retrovirais: o  $\gamma$ -vetor retroviral, derivado do vírus da leucemia murina (MLV) e os vetores lentivirais (VL), derivados principalmente do vírus do HIV. Entretanto, o sistema de lentivírus apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de transduzir células em de parada mitótica, como neurônios, o padrão de inserção apresenta menor risco de desenvolver mutações e eles podem ser concentrados gerando uma maior titulação, devido à estabilidade da glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (Merten et al., 2016).

Os lentivírus pertencem à família Retroviridae e são caracterizados pela presença de um genoma RNA que é convertido em DNA na célula transduzida a partir de uma enzima chamada, transcriptase reversa. Esses vírus possuem três genes básicos para manutenção de sua sobrevivência e atividade, sendo eles, os genes gag, pol e env. O gene gag codifica as proteínas estruturais, o pol codifica as enzimas necessárias para transcrição reversa e integração no genoma da célula hospedeira, enquanto env é responsável pela produção relacionada às glicoproteínas virais presentes no envelope (Milone e O'Doherty, 2018).

A primeira geração de vetores produzidos era composta por uma parte significativa do genoma HIV, com os genes pol e gag e outros genes acessórios. Ao envelope viral foi adicionada a proteína do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) o que garantiu a infecção do vírus em maior quantidade de células. Em seguida, houve o desenvolvimento de uma segunda geração de vetores, considerados mais seguros, devido à retirada de genes acessórios, vif, vpr e nef, relacionados à sobrevivência do vírus, mas isso não impedia a transferência do material genético para a célula hospedeira. Já na terceira geração desenvolvida, o genoma viral foi separado em quatro plasmídeos, o que diminuía a chance de recombinação para produção de um vírus competente. Um deles composto pelos genes gag e pol, outro expressando o gene rev, importante para a replicação viral, outro carregando o gene env e um último plasmídeo constituído pelo cassete de expressão do transgene, associado a um promotor heterólogo (Merten et al., 2016; Milone e O'Doherty, 2018).

Além disso, esses vetores de terceira geração também tiveram a região promotora (U3) da região 3' LTR removida e com isso a propriedade SIN (*Self*

*Inactivating*) também foi adicionada, o que aumentou a segurança para utilização, visto que diminuiu o risco de recombinação para formação de lentivírus com replicação competente e também diminuiu a interferência do promotor (Naldini et al., 2016).

Os vetores lentivirais tornaram-se atrativos pela possibilidade de aplicação clínica, devido a sua capacidade de transduzir de maneira eficiente células não proliferativas ou que se proliferam lentamente (Milone e O'Doherty, 2018), através de um sistema considerado simples (Kumar e Ratwan, 2016). Além disso, esses vetores são capazes de realizar a integração estável do seu material genético, permitindo a expressão constante do transgene ou realização de knockdown de genes de interesse (De Bruyans et al., 2016). A propagação do transgene para as gerações subsequentes por longo período e com uma expressão constante já foi observado no trabalho de Chandrashekran et al. (2014) em que foi demonstrada a expressão da proteína GFP em uma gama de tecidos murinos por até três gerações. Também foi demonstrado a possibilidade de se trabalhar com sequencias em torno de até 12 a 15kb (Zheng et al., 2018). Em contrapartida, algumas desvantagens desse sistema incluem a restrição em relação ao local inespecífico de inserção do transgene, o que pode vir a causar efeitos indesejados, como ativação de protooncogenes (Zheng et al., 2018).

Vetores virais já são amplamente utilizados para produzir proteínas recombinantes humanas em células mamíferas em cultivo, como as Chinese Hamster Ovary (CHO) cells (Bandaranayake e Almo, 2013).

Nos últimos anos, houve substancial desenvolvimento de tecnologias relacionadas a transgenia com vetores lentivirais, entretanto, a produção dos VLs e sua aplicação para obtenção dos organismos GMs (OGMs) ainda possui dificuldades inerentes ao estabelecimento de um protocolo otimizado para produção dos VLs; exigência de conhecimento amplo de técnicas de biologia molecular; e baixa eficiência da produção de organismos efetivamente modificados (Mátra et al., 2010; Persons, 2010).

Atualmente, a produção de animais geneticamente modificados (AGMs) empregando VLs é feita invariavelmente por dois métodos: injeção no espaço perivitelínico dos VLs no zigoto em fase de pró-núcleo ou no oócito após a maturação, a partir dos quais já foram gerados bovinos expressando o gene da proteína verde fluorescente (Hofman et al., 2004; Otero et al., 2018); infecção em células para posterior utilização como doadoras de núcleo para a clonagem animal.

De maneira a contornar as dificuldades relacionadas à produção de animais GMs, passou a ser estudado, a partir do trabalho de Zhang et al., (2012), a capacidade dos espermatozóides carregarem VLs de modo a mediar a produção de embriões GMs. Dentro desse contexto, o mesmo grupo promoveu a otimização do protocolo e corroboraram com os achados anteriores, produzindo evidência da produção de animais GMs a partir dessa técnica via inseminação artificial (Cai et al., 2012). Os autores relataram encontrar, por quantificação com qPCR, uma média de  $62 \pm 3$  partículas virais por 100 espermatozoides, sendo a adesão desses vírus ao espermatozóide confirmada por microscopia eletrônica. O transgene empacotado no vírus utilizado nesse estudo foi encontrado em 10,17% dos animais produzidos por inseminação (Zhang et al., 2012). Em estudo mais recente, verificou-se que espermatozoides de camundongos incubados por 3h com VLs em uma concentração de  $10^6$  partículas virais/mL também poderiam gerar animais geneticamente modificados via fecundação *in vitro*, alcançando uma proporção de 42% dos nascidos (Chandrashekran et al., 2014).

A partir dos estudos iniciais com espermatozoides como carreadores dos vetores lentivirais em suínos e camundongos, evidencia-se a possibilidade de uso também em bovinos via fecundação *in vitro*. Entre as vantagens, há o fato de que bovinos são capazes de produzir grande quantidade de leite por onde podem ser extraídas as PRHs, o que demandaria poucos animais para atender as demandas comerciais, visto que uma vaca tem a capacidade de secretar 8000 litros de leite por ano, o que potencialmente corresponderia a uma produção de 40 kilos de proteínas de interesse farmacêutico por ano (Houdebine, 2018). Em estimativa de produção, verificou-se que três vacas seriam suficiente para atender o mercado norte-americano de antitrombina III, já com cabras seriam necessárias 35 (Wall et al., 1997), o que facilitaria o manejo e adoção de medidas de biossegurança com os animais em menor número; além disso, a fecundação *in vitro* permite a produção dos embriões em laboratório e a análise da modificação gênica antes de transferir para receptoras no campo, contribuindo não apenas na redução de custos e garantindo somente o nascimento de animais com a modificação gênica desejada, como também contribuindo para a biossegurança pelo maior controle de todo o processo em laboratório do que na inseminação artificial no campo. Contudo, ainda não há estudos que comprovem a

capacidade de se gerar embriões bovinos geneticamente modificados por fecundação *in vitro* com espermatozoides carregando vetores lentivirais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho dos vetores de expressão com o gene fator de coagulação humano IX

Os vetores de expressão contendo o gene de interesse, fator IX de coagulação humano (GeneID 2158) dispostos na Figura 1, foram previamente desenhados com a ferramenta Vector Builder (Vectorbuilder.com). Foram construídos dois plasmídeos (Figura 2 e 3) sobre o molde inicial do vetor de expressão pLenti-6.3, sendo um dos vetores produzido com o cDNA do gene de interesse regulado pelo promotor da beta-caseína bovina e o outro com o promotor da beta-caseína caprina. Os construtos de DNA foram sintetizados pela GeneOne Life Sciences.

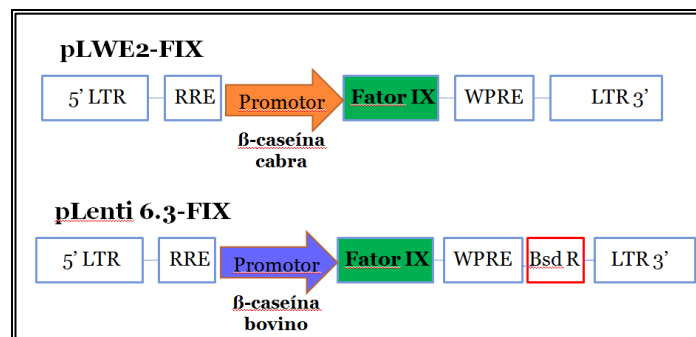


Figura 1. Diagramas dos vetores lentivirais (pLWE2-FIX e pLenti6.3-FIX) construídos sobre o molde inicial do vetor de expressão pLenti-6.3p.

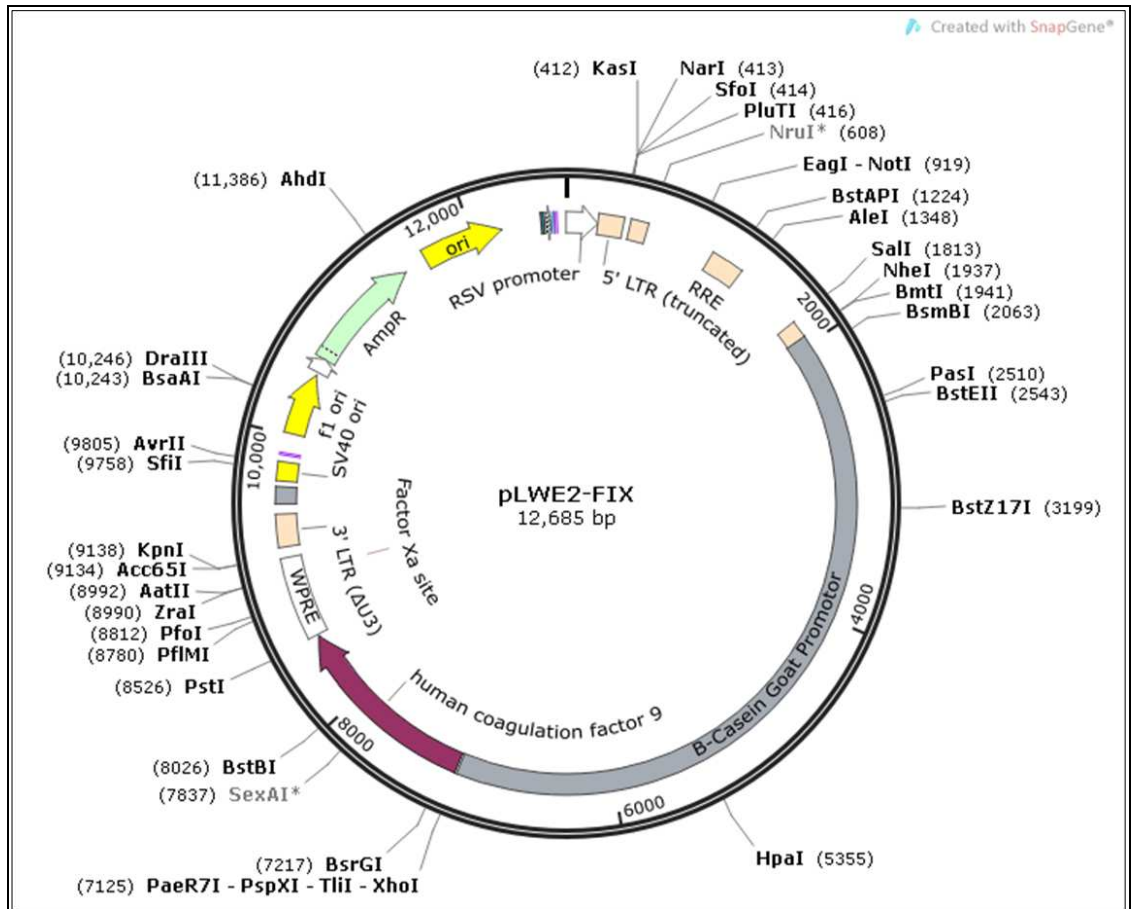


Figura 2. Mapa do plasmídeo recombinante pLWE2-FIX com o gene do fator IX de coagulação sanguínea humana dirigido pelo promotor  $\beta$ -caseína de cabra (software SnapGene Viwer 2.0.1).

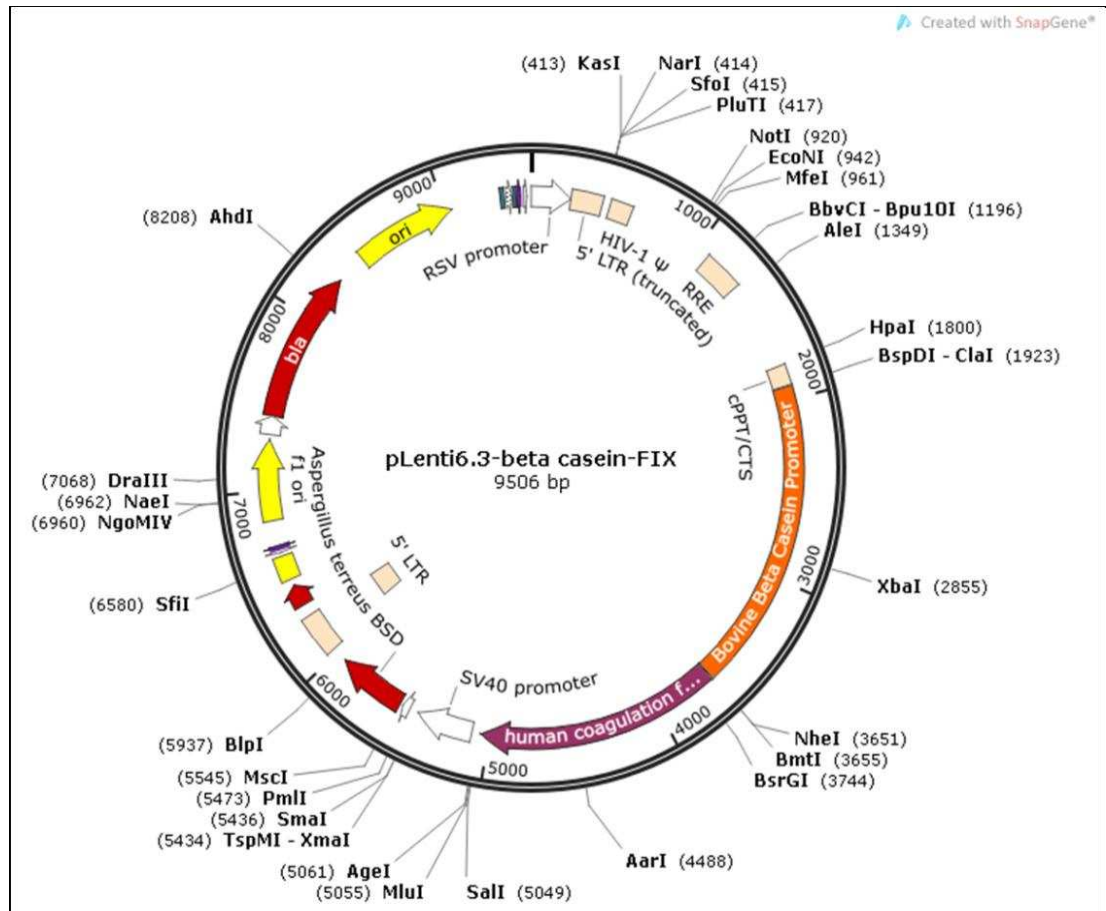


Figura 3. Mapa do plasmídeo recombinante pLenti6.3-beta casein-FIX com o gene do fator IX de coagulação sanguínea humana dirigido pelo promotor  $\beta$ -caseína bovina (software SnapGene Viwer 2.0.1).

### 3.2 Amplificação, extração e purificação dos construtos de DNA

Os vetores de empacotamento, pRSV-Rev; pMDLG/pRRE; pMD2.G (Adgene, EUA) foram clonados em *Escherichia coli* DH5-alfa. Os vetores de expressão descritos anteriormente foram amplificados em *Escherichia coli* SBTL3. A cultura das bactérias e extração dos plasmídeos foi realizada conforme recomendações do fabricante utilizando o Kit MaxiPrep (Qiagen). A identidade dos construtos de DNA foi confirmada por ensaio de restrição e corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, sendo os fragmentos de restrição analisados conforme critérios resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Tamanhos dos fragmentos de restrição e enzimas utilizadas para caracterização dos vetores utilizados na produção das partículas virais.

Construto	Enzima	Tamanhos dos fragmentos (pb)	Tamanho não cortado (pb)
pRSV-Rev	PvuII	1340 e 2840	4171
pMDLg/pRRE	ApaI	1246 e 7644	8895
pMD2.G	ApaI	1246 e 4576	5824
pLWE2-FIX	ClaI	1251 e 11458	12709
pLenti 6.3-FIX	ApaI	1246 e 8832	10078
pLGW-GFP	BamHI	6963 e 595	7558

Pb: pares de base

### 3.3 Cultura de células para empacotamento

As células HEK 293 FT (ThermoFisher, EUA) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco); 2mmol/L de l-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA); 100 U.I./mL de penicilina (Sigma-Aldrich, EUA); e 100µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora Thermo Fisher com pressão parcial de CO<sub>2</sub> de 5% e temperatura de 37°C.

### 3.4 Co-transfecção dos vetores virais

As células HEK 293 FT, previamente descritas, foram descongeladas e expandidas até que houvesse um número de células suficiente para plaquear 5x10<sup>5</sup> células em cada um dos poços em placa de 6 poços. Para cada vetor de expressão, pLGW-GFP; pLWE2-FIX; e pLenti 6.3-FIX, foi utilizada uma placa e a co-transfecção foi feita em triplicata. Para a co-transfecção, 4µg de cada um dos plasmídeos foi diluído em 465 microlitros (µl) de meio Opti-MEM (GIBCO, EUA) e, em seguida, adicionados 30µL de FUGENEHD (Promega). Em seguida, o complexo DNA- Fugene foi adicionado às células e permaneceram incubadas com ele por 48 horas. As concentrações e protocolo foram utilizados conforme orientação do fabricante com adaptações seguindo o protocolo otimizado para produção vetores lentivirais de Wang (Wang.e Mcmanus, 2009).

### 3.5 Concentração das partículas virais

Após 48 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante da cultura de células utilizadas para o empacotamento dos vetores lentivirais foi coletado e processado com o sistema de concentração lentiviral Lenti-X Concentrator (Clontech, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, os concentrados virais foram congelados em ultrafreezer Thermo-Fisher a -80°C.

### 3.6 Titulação das partículas virais por qRT-PCR

Os RNA dos concentrados virais foram extraídos com o QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as especificações do fabricante, e realizada a síntese do cDNA com o Superscript III First-Strand (Invitrogen, EUA).

A titulação dos vetores lentivirais produzidos foi feita a partir da reação de polimerase em cadeia quantitativa em termociclador de tempo-real (7200, Applied Biosystems). Para isso, foi utilizado 3ng de cDNA obtido na etapa anterior e o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Os primers utilizados estão dispostos na Tabela 2 e foram desenhados de forma que a temperatura de anelamento fosse calculada para 62°C.

Tabela 2. Primers construídos para a quantificação das partículas virais.

Alvo gênico nos vetores de expressão	Primers	Tamanho de fragmento (bp)
Fator de coagulação IX (pLWE2-FIX)	F: TTGCTCCTGTA CT GAGGGATA R: ACGGGTGAGCTTA GAAGTTTG	112
Promotor da beta-caseína caprina (pLWE2-FIX)	F: TGAGTTGCGTCTGACTGTTATC R: GAAATGCAATCCACTCCAGTATTC	101
GFP (pLGW-GFP)	F: CACATGAAGCAGC ACGACTT R: AGTTCACCTTGAT GCCGTTTC	214

F: Sequência direta; R: Sequência reversa

Foi estabelecida a curva padrão através de diluição seriada com o plasmídeo pLWE2, o qual foi relacionado com o número de cópias do plasmídeo em cada diluição. A partir desse resultado, foi calculada a média da triplicata dos valores

obtidos através da curva padrão, o que correspondeu ao número de cópias da amostra de partícula viral em cada mililitro de solução.

### **3.7 Produção de células transduzidas**

As partículas virais foram utilizadas para transdução de células HEK 293 (Human Embryonic Kidney cells), MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney cells), originárias de rim de humano e bovino, respectivamente, e fibroblastos bovinos crescidos em cultivo celular.

#### **3.7.1 Transdução com a partícula viral pLWE2-FIX**

As células do fibroblasto foram descongeladas e transduzidas com a partícula viral pLWE2-FIX testando dois valores de multiplicidade de infecção (MOI), a fim de estabelecer a quantidade adequada de partículas virais necessária para estabelecer uma transdução eficiente em relação ao número de células presente. A MOI foi calculada através da multiplicação do volume de solução de vírus pela titulação viral dividida pela quantidade de células no poço ( $0,3 \times 10^6$  células). Foi escolhido para teste os valores de MOI 5 e 10 referentes à adição de 71 e 142  $\mu\text{l}$ , respectivamente, de solução viral a uma concentração de  $2,1 \times 10^7$  cópias por mililitro.

A transdução das células foi realizada após troca do meio de cultivo completo (10% Soro Fetal Bovino, 1% de glutamina, 1% Streptomicina/Penicilina, 88% DMEM) por meio de cultivo com adição das partículas virais durante 18 h. As células transduzidas foram cultivadas em meio de cultivo completo por 48 h e submetidas à seleção com antibiótico de resistência, blasticidina (Santa Cruz Biotechnology), presente na partícula viral.

As células foram observadas em microscópio invertido (Axiovert 135 M- Carl Zeiss) no D4 (início da seleção) e D9 (cinco dias após início da seleção) para avaliar o seu desenvolvimento.

#### **3.7.2 Transdução com a partícula viral pLGW-eGFP**

A transdução das células foi realizada após troca do meio de cultivo completo (DMEM, suplementado com 2mM L-glutamina, 1% de penicilina e 10% de soro fetal bovino), por meio de cultivo com adição das partículas virais a uma concentração de

$2 \times 10^7$  partículas por mililitro durante 18h. As células transduzidas foram cultivadas em meio de cultivo completo e observadas em microscópio de fluorescência (Axiovert 135 M- Carl Zeiss).

### **3.8 Delineamento experimental**

O estudo foi dividido em dois experimentos. No experimento 1, lentivirus (LV) foram incubados com oócitos maturados *in vitro* e espermatozóides durante a fertilização *in vitro* (FIV) por 18h, de modo a estabelecer três grupos: FIV-controle (FIV sem incubação de lentivírus); FIV-FIX (FIV com LV pLWE2-FIX); FIV-GFP (FIV com LV pLGW-GFP). No experimento 2, os lentivirus foram co-incubados com zigotos presuntivos durante o cultivo *in vitro* (CIV) por 22h, estabelecendo assim três grupos: CIV-controle (CIV sem nenhum lentivirus); CIV-FIX (CIV com LV pLWE2-FIX) e CIV-GFP (CIV com LV pLGW-GFP)

### **3.9 Produção de oócitos maturados para fertilização *in vitro***

Foram utilizados oócitos (n=670) obtidos de ovários de vacas e novilhas abatidas em matadouro-frigorífico comercial com Serviço de Inspeção federal (SIF). Eles foram maturados *in vitro* por 22h em estufa incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar usando meio de maturação (TCM 199) enriquecido com 10% soro fetal bovino (ou soro de vaca em cio) e 10 µg/mL hormônio folículo estimulante (FSH). Ao final da maturação, os oócitos foram transferidos para o meio de fertilização *in vitro* de maneira aleatória.

### **3.10 Capacitação dos espermatozóides bovinos**

Foram utilizadas palhetas de sêmen comerciais congeladas. Após descongelamento das palhetas em banho-maria a 37°C por 30 seg, os espermatozoides foram selecionados por gradiente de concentração usando Percoll 90% e 45% por 7 min de centrifugação a 8000 rpm. Os espermatozoides foram avaliados quanto à motilidade (0-100%) e vigor (0-5) por microscopia óptica (Nikon Eclipse E200) em aumento de 20 e 40x. Após a centrifugação, o pellet com espermatozoides foi recuperado e suspenso em solução de fecundação (FERT).

Espermatozoides ( $2 \times 10^6$ /mL) foram então transferidos para a gota dos oócitos para ocorrer a fertilização *in vitro*.

### **3.11 Fertilização *in vitro* (FIV)**

Oócitos maturados *in vitro* e os espermatozoides capacitados passaram pela etapa de fertilização *in vitro* por 18h em incubadora a 38,5 °C em 5% CO<sub>2</sub> em meio Fert-TALP.

### **3.12 Cultivo embrionário *in vitro* (CIV)**

Após a fertilização *in vitro* os zigotos presuntivos foram incubados a 38,5 °C em 20% O<sub>2</sub> em ar. Foi realizado o *feeding* e avaliação da taxa de clivagem no dia 4 após início da fertilização *in vitro* e avaliação da taxa de blastocistos nos dias 7 e 8.

### **3.13 Avaliação da expressão de GFP em embriões bovinos fertilizados *in vitro***

Embriões cultivados *in vitro* foram visualizados em microscopia de epifluorescência em microscópio invertido para identificação da fluorescência do GFP. As avaliações foram realizadas nos dias 4 e 8 após a fertilização *in vitro*.

### **3.14 Análise de PCR para detecção do gene FIX e GFP em embriões**

Os embriões e as células do cumulus presentes foram analisados quanto à presença do transgene FIX e GFP nos dias 4 e 8 de desenvolvimento (n = 20 por tratamento) via PCR. Os embriões e células foram lavados em PBS e transferidos para tubos de 0,6mL, onde permaneceram congelados até a sua utilização. Para digerir a membrana celular e ocorrer a liberação do DNA, 10µL da solução de extração de DNA (5X tampão de PCR e 0,2 mg/ml, de proteinase K) foram adicionados às amostras e incubados por 15 min a 56°C, e, em seguida, 10 min a 95°C para inativar a proteinase K antes da realização do PCR. A amplificação foi realizada utilizando a enzima Phusion Taq DNA polimerase e os primers desenhados para os transgenes descritos anteriormente na Tabela 2. As etapas de amplificação foram: 98°C por 30 seg, seguido de 35 ciclos a 98°C por 5 segundos, 65°C por 10 segundos e a extensão final foi 72°C por 20 segundos. A presença de fragmento amplificado foi confirmado através de corrida eletroforética em gel de agarose a 2%. Amostras de plasmídeo com

o gene de expressão foram utilizados como controle positivo da amplificação e a amostras sem presença do alvo foram utilizadas como controle negativo (NTC).

### 3.15 Análise estatística

Dados de desenvolvimento embrionário (clivagem, blastocistos e expressão de GFP) foram comparados por análise de Qui-quadrado, de acordo com a normalidade dos dados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Amplificação, extração e purificação dos construtos de DNA

Na Figura 4 é possível observar os fragmentos gerados que foram comparados aos fragmentos esperados descritos anteriormente na Tabela 1.

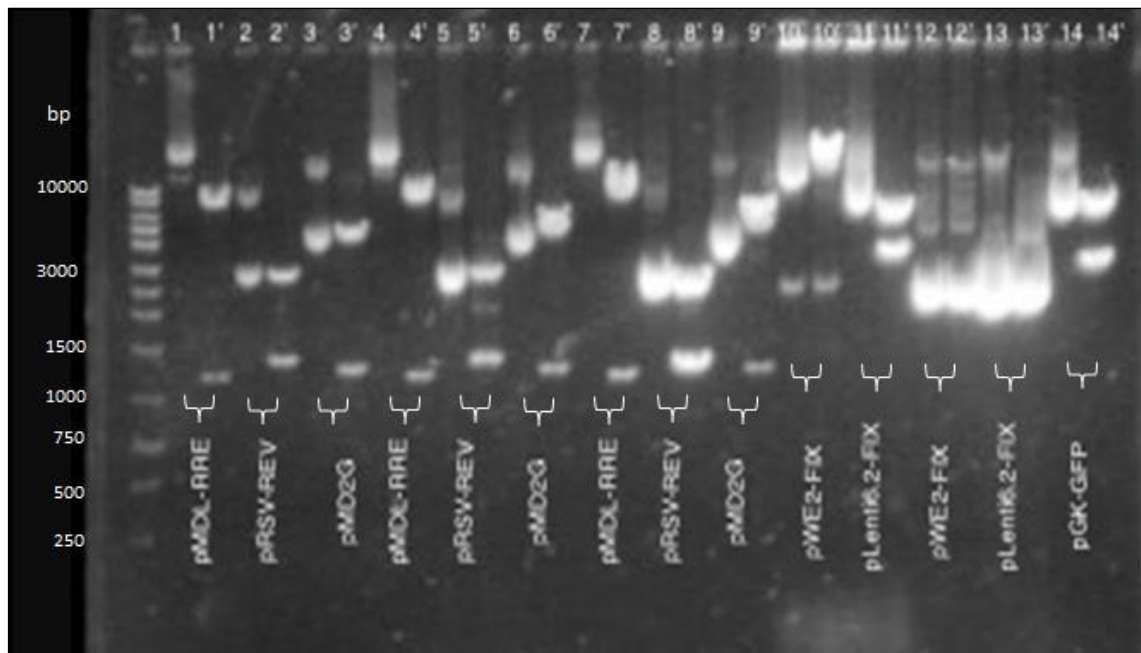


Figura 4. Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% dos fragmentos de restrição utilizados para caracterização dos vetores utilizados na produção das partículas virais.

## 4.2 Titulação das partículas virais por qRT PCR

A curva de amplificação feita através de uma diluição seriada com o plasmídeo pLGWE2 está apresentada na Figura 5 e a curva padrão na Figura 6. O valor obtido para o coeficiente  $R^2$  foi de 0.998083 e para o coeficiente slope foi de  $-4.590497$ .

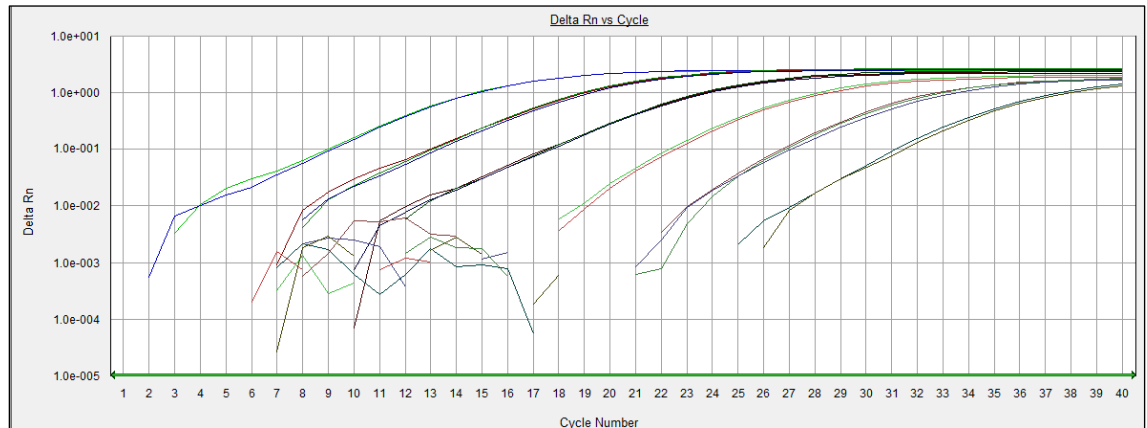


Figura 5. Curva de amplificação referente à diluição seriada do plasmídeo pLWE2-FIX.

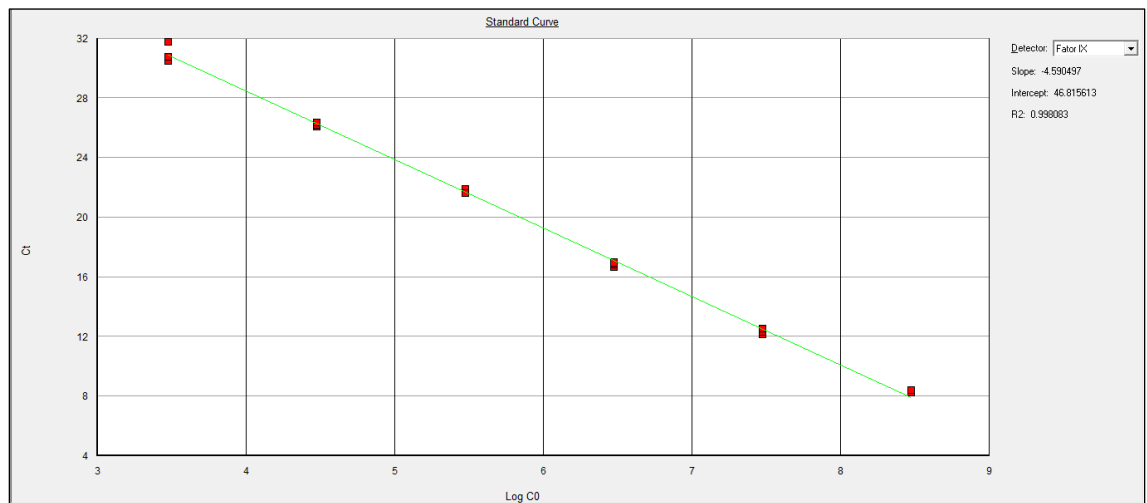


Figura 6. Curva padrão referente ao plasmídeo pLWE2-FIX.

A quantidade de cópias obtidas foi de  $2.10 \times 10^6$  cópias/uL, o que corresponde a  $2.10 \times 10^9$  cópias/mL.

### 4.3 Produção de células HEK, MDBK e Fibroblastos transduzidos

#### 4.3.1 Transdução com a partícula viral pLWE2-FIX

Na primeira avaliação após retirada das partículas virais (D4), notou-se que as células do tratamento com MOI 5 apresentou uma taxa de proliferação similar ao do grupo controle, enquanto as células do tratamento com MOI 10 apresentou uma taxa menor.

Entretanto, após adição do antibiótico de seleção ao meio de cultivo das células foi observado no D9 que as células de ambos tratamentos haviam morrido, enquanto as do controle apresentavam-se confluentes na placa (Figura 7).

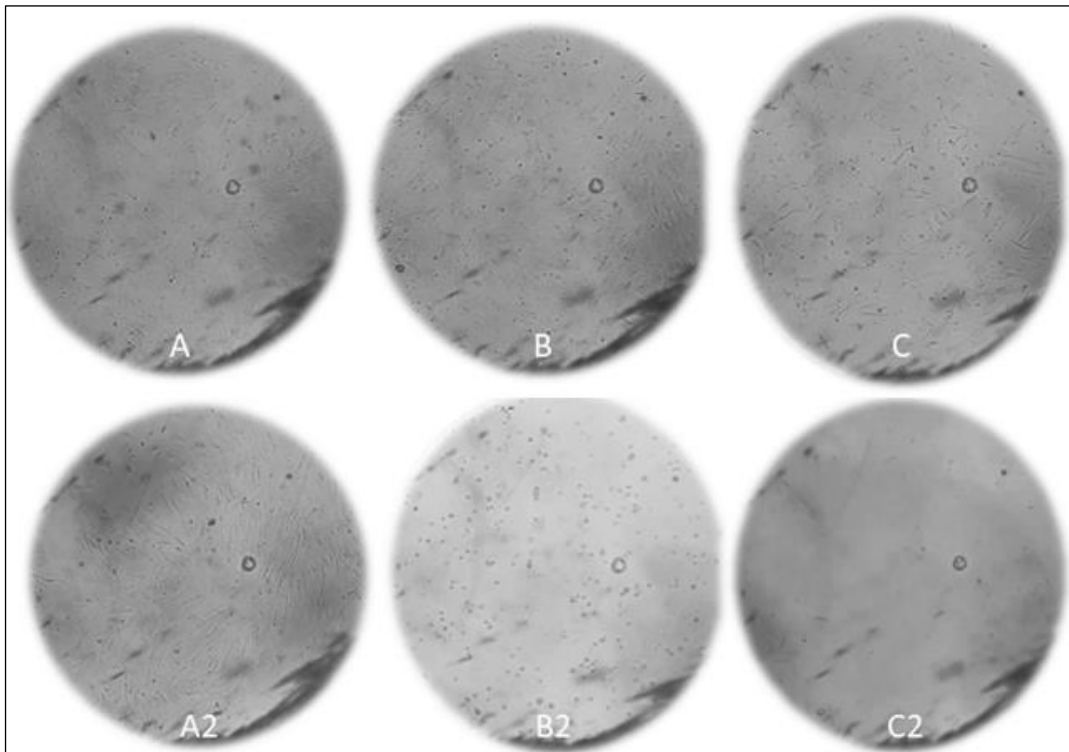


Figura 7. Imagem de microscópio invertido com objetiva de 10x de fibroblastos após seleção com antibiótico. A: Dia 4 (D4) de fibroblastos controle; A2: Dia 9 (D9) de fibroblastos controle; B: D4 de fibroblastos tratados com multiplicidade de infecção (MOI) de valor 5; B2: D9 de fibroblastos tratados com MOI de valor 5; C: D4 de fibroblastos tratados com MOI de valor 10; C2: D9 de fibroblastos tratados com MOI de valor 10.

#### 4.3.2 Transdução com a partícula viral pLGW-eGFP

Após transdução de células HEK e MDBK com o vetor pLGW, foi detectada a expressão do GFP em ambos cultivos celulares (Figura 8). Entretanto, também não foi possível selecionar as células após adição do antibiótico blasticidina ao meio de cultivo, pois todas as células morreram.

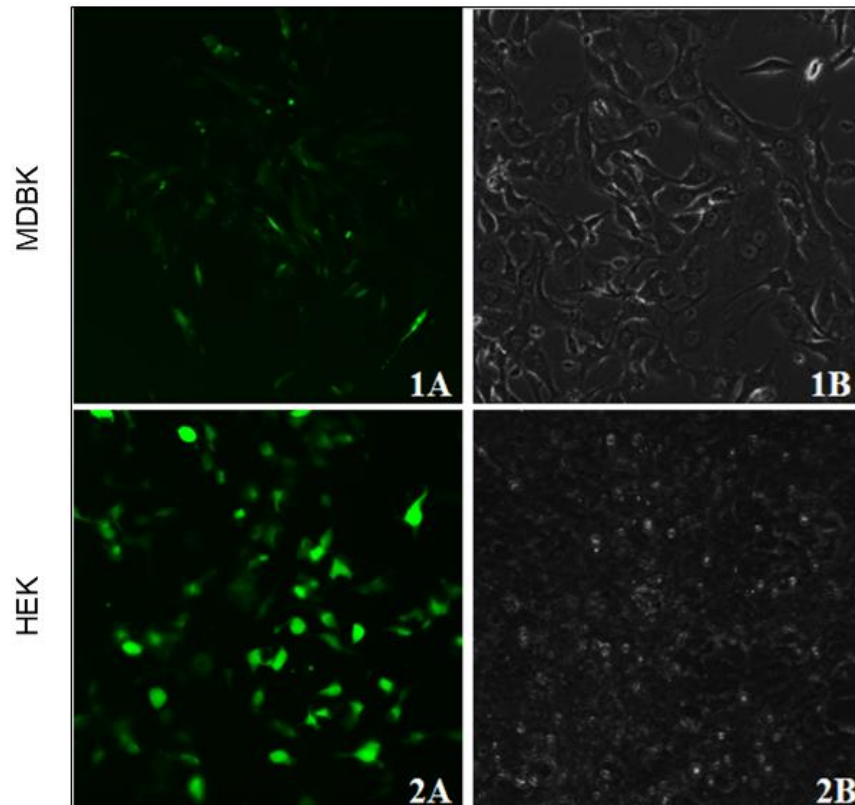


Figura 8. Imagem de microscópio invertido com objetiva de 20x de células transduzidas. 1A: Células MDBK sob luz fluorescente demonstrando expressão do GFP em algumas células; 1B: Células MDBK sob luz clara demonstrando morfologia das células; 2A: Células HEK sob luz fluorescente demonstrando expressão do GFP em algumas células; 2B: Células HEK sob luz clara demonstrando morfologia das células.

#### 4.4 Produção *in vitro* de embriões

Os resultados referentes à taxa de produção *in vitro* dos embriões bovinos produzidos foram resumidos de acordo com a Tabela 3 e 4.

Tabela 3. Efeito de co-incubação de vetores lentivirais durante a fertilização *in vitro* (FIV) no desenvolvimento embrionário

Grupo	N	Clivagem (%)	Blastocisto D7 (%)	Blastocisto D8 (%)
FIV-Controle	111	58.56 <sup>a</sup>	27.63 <sup>a</sup>	27.63 <sup>a</sup>
FIV-FIX	128	43.75 <sup>b</sup>	5.33 <sup>b</sup>	6.67 <sup>b</sup>
FIV-GFP	132	51.51 <sup>ab</sup>	7.23 <sup>b</sup>	6.02 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup>, Letras diferentes entre as linhas demonstra diferença ( $P < 0.05$ ). GFP: proteína verde fluorescente; FIX: fator IX de coagulação humana; D7: dia 7 de desenvolvimento; D8: dia 8 de desenvolvimento

Tabela 4. Efeito da co-incubação de vetores lentivirais durante o cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos presuntivos no desenvolvimento embrionário.

Grupo	N	Clivagem (%)	Blastocisto D7 (%)	Blastocisto D8 (%)
CIV-Controle	65	63.08	20.83	29.17
CIV-FIX	122	60.66	22.54	25.35
CIV-GFP	111	54.95	17.91	17.91

Não houve diferença entre as linhas ( $P > 0.05$ ). GFP: proteína verde fluorescente; FIX: fator IX de coagulação humana; D7: dia 7 de desenvolvimento; D8: dia 8 de desenvolvimento

#### 4.4.1 Embriões produzidos para expressão do GFP

Foi possível constatar, através da observação em microscópio invertido (Figura 9), nos dias 4 (D4) e 8 (D8) de desenvolvimento, a presença da expressão do transgene GFP nas células do cumulus dos embriões clivados dos grupos submetidos à co-incubação com VLs.

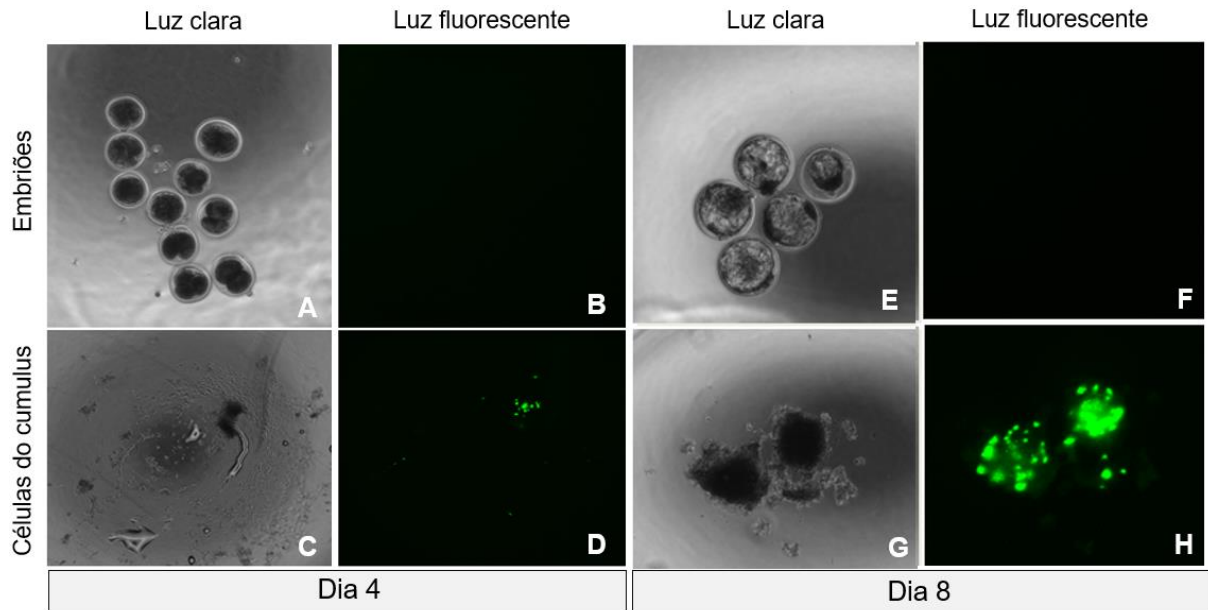


Figura 9. Imagens de embriões e células cumulus no quarto e no oitavo dia após a fertilização do grupo FIV-GFP. Embriões clivados da fertilização in vitro com co-incubação com pLGW-GFP sob luz clara(A) e sob luz fluorescente (B), sem expressão de GFP. Células cumulus do mesmo grupo, sob iluminação clara (C) e sob luz fluorescente (D), mostrando expressão de GFP. Blastocistos oriundos de fertilização in vitro (FIV) com co-incubação com pLGW-GFP sob luz clara (E) e sob luz fluorescente (F), não mostrando expressão de GFP. Células cumulus do mesmo grupo, sob luz clara (G) e sob luz fluorescente (H), mostrando expressão de GFP. Aumento de 40x

#### 4.5 Análise de PCR para detecção do gene GFP e FIX em embriões e células do cumulus

Foi realizada a amplificação utilizando primers específicos para as regiões do GFP e FIX, e foi constatada a presença dos transgenes em duas amostras de células do cumulus do grupo CIV-GFP e CIV-FIX (Figura 10). Não foi detectado os transgenes em amostras de embriões clivados e blastocistos dos grupos FIV-GFP, FIV-FIX, CIV-GFP e CIV-FIX.

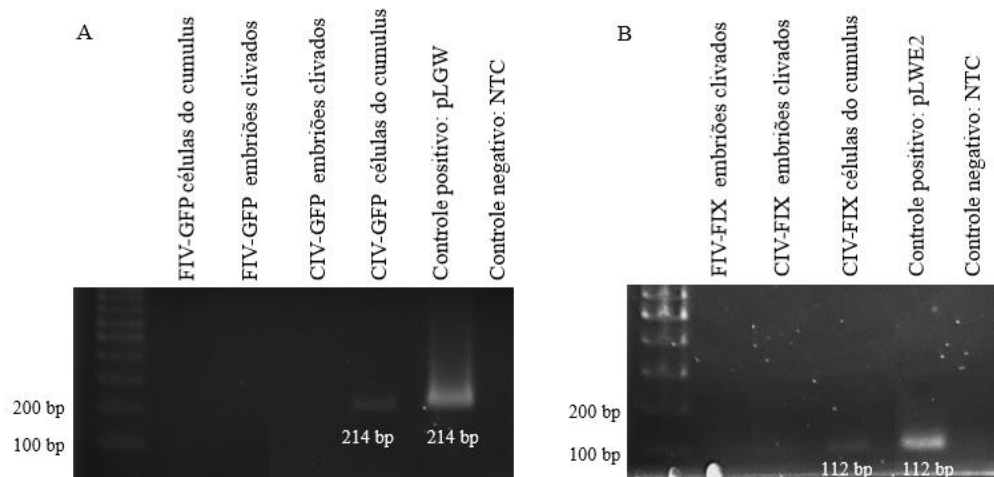


Figura 10. Imagem de eletroforese em gel de agarose a 2% de fragmentos de PCR amplificados para o alvo do transgene GFP (A) ou Fator IX (B) das amostras de embriões e células do cumulus. FIV-GFP: fertilização *in vitro* com LV pLGW-GFP; CIV-GFP: cultivo *in vitro* com LV pLGW-GFP; FIV-FIX: fertilização *in vitro* com LV pLWE2-FIX; CIV-FIX: cultivo *in vitro* com LV pLWE2- FIX; NTC: no template control.

## 5. DISCUSSÃO

A demanda na produção de proteínas recombinantes humanas corresponde a uma parcela importante no mercado farmacêutico, porém a produção dessas proteínas utilizando AGMs ainda apresenta como principal desafio o baixo índice na geração desses animais, muitas vezes devido à dificuldade na implementação de técnicas de transgenia e seu alto custo. Entretanto, espera-se um crescimento na utilização de AGMs como biorreatores, visto que possuem potencial para produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes e, assim, implicando na diminuição dos custos, tanto operacionais quanto do produto final. Na literatura, diversas técnicas e padrões de otimização são discutidos com objetivo de aumentar a taxa de sucesso na geração desses animais, porém não existem relatos de produção *in vitro* (PIV) de embriões geneticamente modificados utilizando espermatozóides bovinos como carreadores de VLs.

A partir da produção das partículas virais, foi realizada a transdução de células utilizando as partículas virais contendo o gene de expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Apesar de ter sido possível confirmar visualmente a expressão do GFP nas células (HEK e MDBK), o que indica a capacidade de infecção das partículas virais, não foi possível selecionar as células transduzidas que deveriam apresentar resistência para o antibiótico blastocidina. Resultado similar também foi encontrado

com a transdução das partículas virais com o gene de expressão do fator IX de coagulação humana (FIX). Esse resultado difere de achados de outros trabalhos que utilizaram vetores lentivirais para estabelecimento de linhagens celulares (Mohammedian et al., 2019; Mao et al., 2015; Sarkis et al., 2006). Entretanto, também já foram relatadas dificuldades na expressão do transgene de interesse devido ao baixo número de cópias, padrão de metilação e modificação das histonas o que pode levar ao silenciamento do transgene (Chen et al., 2015; Chanda et al., 2017).

Trabalhos anteriores demonstraram que VLs precisam ser microinjetados no espaço perivitelínico ou co-incubados com embriões sem a presença da zona pelúcida para serem efetivos (Pfeifer e Hofmann, 2009). Entretanto, estudos com camundongos demonstraram que os VLs ao serem incubados com semen fresco podem ser utilizados na fertilização para produção de animais transgênicos (Chandrashekran et al., 2014, Chandrashekran et al., 2016). E outro estudo demonstrou que a associação de VLs com sêmen fresco de suíno também podia ser aplicado na inseminação artificial gerando leitões transgênicos (Zhang et al., 2012).

Ambos estudos citados anteriormente utilizaram sêmen fresco, enquanto, no presente trabalho foi utilizado sêmen congelado de touro selecionado. Experimentos prévios realizados pela nossa equipe em que se fez a co-incubação dos espermatozoides com as partículas virais em etapa anterior à FIV apresentaram resultados insatisfatórios de motilidade e vigor. Essa ocorrência pode ser justificada devido a membrana do espermatozóide ser considerada um local primário de dano em semen criopreservado, principalmente devido a perda de esteróis e deste modo podendo prejudicar a viabilidade, motilidade, integridade do DNA, levar a alterações no acrossoma e mitocôndria, e gerar estresse oxidativo nos espermatozoides. (Papa et al., 2015; Ushiyama et al., 2016; Gurler et al., 2016). Portanto, foi adotado a co-incubação das partículas virais com os espermatozoides durante a FIV, de modo a favorecer as taxas de fertilização dos espermatozoides associados às partículas virais.

A partir da incubação lentiviral dos trabalhos de Zhang et al. (2012) e Chandrashekran et al. (2014) foram obtidos embriões fluorescentes, ou seja, confirmando a expressão da proteína GFP, porém neste trabalho a expressão da proteína GFP foi confirmada apenas nas células do cumulus dos embriões cultivados, demonstrando a eficiência dos VLs na transdução de células somáticas.

Resultados da produção *in vitro* de embriões demonstrou que as partículas lentivirais reduziram a taxa de clivagem e de blastocistos, quando co-incubadas durante a FIV. Entretanto, quando os VLs foram adicionados para co-incubação durante o cultivo *in vitro* com zigotos presuntivos não houve alteração no desenvolvimento embrionário. Esses resultados sugerem que os VLs prejudicam a competência do espermatozóide durante a FIV, e como consequência, comprometem também a clivagem e o desenvolvimento embrionário em sequência.

O resultado também foi avaliado a partir da extração de DNA de células do cumulus e embriões. Foram detectadas duas amostras positivas de células do cumulus, uma para o gene GFP e outra para FIX. Já em relação aos embriões, não foi constatada a presença de insertos, o que pode estar relacionado a não associação do espermatozóide com os VLs, ou a zona pelúcida ter funcionado como uma barreira para a entrada dos VLs. O experimento realizado com a co-incubação dos VLs durante o CIV confirmou que a zona pelúcida funciona como uma barreira impedindo a entrada dos VLs nos zigotos bovinos.

Esse achado diferiu do trabalho de Chandrashekran et al. (2014), que a partir da FIV, os embriões apresentaram inserção do transgene no genoma e transferência estável por até três gerações. Entretanto, Chandrashekran et al. (2014) produziram os lentivírus com stem cell factor (SCF) em sua membrana, uma proteína com a finalidade de se ligar ao receptor c-kit expresso na membrana dos espermatozoides murinos. Assim, é possível que para os lentivirus utilizados nesse trabalho fosse necessária uma avaliação da interação dos espermatozoides bovinos com os lentivirus.

Assim, concluímos que no presente estudo a co-incubação de VLs durante a FIV ou CIV falhou em realizar a entrega do transgene em embriões bovinos, demonstrando que a zona pelúcida funciona como uma barreira para a penetração dos VLs em zigotos. Além disso, foi constatado que a presença de VLs durante a FIV foi prejudicial ao desenvolvimento embrionário, afetando a taxa de clivagem e blastocistos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M.E. *et al.* **Effect of transfection and co-incubation of bovine sperm with exogenous DNA on sperm quality and functional parameters for its use in sperm-mediated gene transfer.** *Zygote*, vol. 25, p. 85-97, 2016. Doi: 10.1017/S096719941600037X

BACCI, M.L. *et al.* **Sperm-mediated gene transfer–treated spermatozoa maintain good quality parameters and in vitro fertilization ability in swine.** *Theriogenology*, vol. 72, p. 1163-1170, 2009. Doi:10.1016/j.theriogenology.2009.06.033

BANDARANAYAKE, A.; ALMO, S. **Recent advances in mammalian protein production.** *FEBS letters*. Vol.588, ed. 2, 2013. Doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.035.

BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN D.T. *et al.* **Production of goats by somatic cell nuclear transfer.** *Nature Biotechnology*, vol. 17, 1999. Doi:10.1038/8632

BERTOLINI, L. R. *et al.* **The transgenic animal platform for biopharmaceutical production.** *Transgenic Research*, vol. 25(3), p. 329–343, 2016. Doi:10.1007/s11248-016-9933-9 1.

BOETTCHER, M.; MCMANUS, M.T. **Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR.** *Molecular Cell Review*. Vol. 58 (4), p.575-585, 2015. Doi:10.1016/j.molcel.2015.04.028

BRESSAN, F.F. *et al.* **Insights on bovine genetic engineering and cloning.** *Pesq. Vet. Bras*. Vol. 33 (Supl.1), p. 113-118, 2013.

BROCK, A. **Protein Drugs: Global Markets and Manufacturing Technologies - BIO021C | BCC Research.** [online]. Bccresearch.com. 2019 [Acessado 3 Dec. 2019]. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/protein-drugs-markets-manufacturing-bio021c.html>

CAI, W. *et al.* **Optimization of Incubation of Sperm and Lentivirus and Transgenic Pigs Production.** *China Agriculture Science*, vol. 46, n. 9, p. 1903-1914, 2012.

CAVALCANTI, P.V. *et al.* **Cell viability of bovine spermatozoa subjected to DNA Electroporation and DNase I treatment.** *Theriogenology*, 2016. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.017

CHANDA, D. *et al.* **Effects of Cellular Methylation on Transgene Expression and Site-Specific Integration of Adeno-Associated Virus.** *Genes*, vol. 8, 2017. Doi: 10.3390/genes8090232

CHANDRASHEKARAN, A.; *et al.* **Efficient generation of transgenic mice by lentivirus-mediated modification of spermatozoa.** *FASEB Journal*. Vol. 28(2), p.569-76, 2014.

CHANDRASHEKARAN, A.; CASIMIR, C.; DIBB, N.; *et al.* **Generating Transgenic Mice by Lentiviral Transduction and Embryo Transfer.** In: FEDERIZO, M. (Ed.) *Lentivirus Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools. Methods in Molecular Biology*, vol. 1448, p. 95-106, 2016. Doi :10.1007/978-1-4939-3753-0

CHEN, X. *et al.* **Sustained high level transgene expression in mammalian cells mediated by the optimized piggyBac transposon system.** *Genes & Diseases*, vol. 2, p.96-105, 2015. Doi: 10.1016/j.gendis.2014.12.001

CHRENEK, P. **Pronuclear Microinjection of Rabbit Fertilized Eggs.** *JSM Cell Dev Biology*. Vol.5 (1), p.1020, 2017.

CHRENEK, P.; *et al.* **Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos.** *Transgenic Research*, Vol.14 (4), p. 417–428, 2005. Doi:10.1007/s11248-005-3238-8

COLLARES, T., *et al.* **Transgenic animals : The melding of molecular biology and animal reproduction.** *Anim. Reprod.*, vol.2. n.1, p.11-27, 2005.

DE BRUYNS, A.; GEILING, B.; DANKORT, D. **Construction of Modular Lentiviral Vectors for Effective Gene Expression and Knockdown.** In: Federico M. (eds) *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools. Methods in Molecular Biology*, vol 1448. Humana Press, New York, NY, 2016.

DOYLE, A. *et al.* **The construction of transgenic and gene knockout / knockin mouse models of human disease.** *Transgenic Research*, vol. 21, p. 327–349, 2012. DOI 10.1007/s11248-011-9537-3

DU, Y. *et al.* **Chimeric Mouse Generation by ES Cell Blastocyst Microinjection and Uterine Transfer.** In: Liu C., Du Y. (eds) *Microinjection. Methods in Molecular Biology*, vol 1874. Humana Press, New York, NY, 2019.

DURAND, S.; CIMARELLI, A. **The Inside Out of Lentiviral Vectors.** *Viruses*. Vol. 3, p. 132-159, 2011. Doi:10.3390/v3020132

ECHELARD, Y.; MEADE, H.M.; ZIOMEK, C.A. **The First Biopharmaceutical from Transgenic Animals: ATryn®.** *Modern Biopharmaceuticals*. P. 995-1020, 2005.

EDWARDS, J.L. *et al.* **Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer.** *Am J Reprod Immunol*. Vol. 50, p.113–123, 2003.

EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature*, vol. 292, 1981

FREITAS, V.J.F. *et al.* **Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil.** *Anais da Academia Brasileira de Ciência*. Vol. 79 (4), p. 585-592, 2007.

GECHELE, E. *et al.* **A Comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect Cells and Plant Systems.** *Journal of Visualized Experiments*. Vol. 97, 2015.

GORDON, J.; RUDDLE, F. **Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.** *Science*. Vol. 214(4526), p.1244-1246, 1981.

GORDON, J. *et al.* **Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 77(12), p.7380-7384, 1980.

GÜRLER, H. *et al.* **Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm.** *Theriogenology*, vol. 86, p. 562-571, 2016. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.007

HOFMANN, A.; *et al.* **Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes.** *Biol Reproduction*. Vol. 71, p. 405-409, 2004.

HOUDEBINE, L.M. **Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals.** Revue Scientifique et Technique. Vol. 37(1), p.131-139, 2018  
Doi:10.20506/rst.37.1.2746

HUANG, X.J. *et al.* **Disruption of the myostatin gene in porcine primary fibroblasts and embryos using zincfinger nucleases.** Molecular Cells, v. 37, p. 302-306, 2014.

HUNTER, P. **The Prospects for recombinant proteins from transgenic animals.** EMBO Reports. Vol. 20, p. 1-3, 2019. doi:10.15252/embr.201948757

HUTCHINSON, J.; MULLER, W. **Transgenic mouse models of human breast cancer.** Oncogene. Vol. 19(53), p.6130-6137, 2000.

KLIMKE, A. *et al.* **Use of CRISPR/Cas9 for the Modification of the Mouse Genome.** In: Moll J., Carotta S. (eds) Target Identification and Validation in Drug Discovery. Methods in Molecular Biology, vol 1953. Humana Press, New York, NY, 2019.

KUMAR, M.; RATWAN, P. **Transgenic or Genetically Modified Farm Animals and their Applications: A Review.** Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology. Vol. 5(3), p.25-34, 2016.

KUMAR PRAMOD, R.; KUMAR, R.; MITRA, A. **Transgenic expression of green fluorescent protein in caprine embryos produced through electroporation-aided sperm-mediated gene transfer.** Gene. 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.066>

KUMAR, S.*et al.* **Sperm Mediated Gene Transfer (SMGT) in Chicken.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Vol. 6, N. 7, p. 4379-4386, 2017. doi:10.20546/ijcmas.2017.607.456

LAVITRANO, M. *et al.* **Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice.** Cell, vol. 57, p. 717-723, 1989

LAVITRANO, M. *et al.* **Sperm-Mediated Genetic Modifications.** In: Larson, E., Transgenic Mouse: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol 2066, 2020. Doi: 10.1007/978-1-4939-9837-1\_5

LTD R. Biopharmaceuticals - **Global Strategic Business Report** [Internet]. Researchandmarkets.com. 2019 [Acessado 4 Dec. 2019]. Available from:

<http://www.researchandmarkets.com/reports/3301135/biopharmaceuticals-global-strategic-business>

LEVINE, S.; GRABEL, L. **The contribution of human/non-human animal chimeras to stem cell research.** Stem Cell Research. Vol. 24, p.128-134, 2017. doi:10.1016/j.scr.2017.09.005

LIEVENS, A. *et al.* **Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement.** Trends in Food Science & Technology. Vol.44(2), p.159-176, 2015.

LILICO, S. *et al.* **Lentiviral transgenesis in livestock.** Transgenic Research. Vol. 20, p. 441-442, 2011. Doi:10.1007/s11248-010-9448-8

LOIS, C. **Generation of Transgenic Animals with Lentiviral Vectors.** In: Pease S., Saunders T. (eds) Advanced Protocols for Animal Transgenesis. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.

LUO, J. *et al.* **Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases.** PLoS One. Vol. 9 (4), 2014.

MA, J.K.; DRAKE, P.M.; CHRISTOU, P. **Genetic Modification: The Production Of Recombinant Pharmaceutical Proteins In Plants.** Nature Reviews Genetics. Vol.4(10), p. 794-805, 2003.

MANESH, S.; SAMANI, R.; MANESH, S. **Ethical issues of transplanting organs from transgenic animals into human beings.** Cell J. Vol.16(3), p.353-360, 2014.

MAO, Y. *et al.* **Lentiviral Vectors Mediate Long-Term and High Efficiency Transgene Expression in HEK 293T cells.** International Journal of Medical Sciences, vol. 12, p. 407-415, 2015. Doi: 10.7150/ijms.11270

MARTIN, G.R. **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.** Developmental Biology. Vol.78(12), p.7634-7638, 1981.

MÁTRAI, J.; MARINEE K.L.C.; THIERRY V. **Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications.** Molecular Therapy. Vol.18(3), p. 477-490, 2010.

MEHTA, P.; SHARMA, A.; KAUSHIK, R. **Transgenesis in farm animals - A review.** Agricultural Reviews, vol. 38 (2), p. 129 – 136, 2017. doi:10.18805/ag.v38i02.7944

MELO, E.O. *et al.* **Animal transgenesis: state of the art and applications.** Journal of Applied Genetics. Vol. 48(1), p.47-61, 2007. DOI: 10.1007/BF03194657

MERLIN, M. *et al.* **Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production In Different Biofactories: The Green Perspective.** BioMed Research International Vol. 2014, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/136419>

MERTEN, O.W.; HEBBEN, M.; BOVOLENTA, C. **Production of lentiviral vectors.** Molecular Therapy — Methods & Clinical Development. Vol. 3, ed. 16017, 2016. doi:10.1038/mtm.2016.17

MILONE, M.C.; DOHERTY, U.O. **Clinical use of lentiviral vectors.** Leukemia. Vol. 32, p. 1529-1541, 2018. doi:10.1038/s41375-018-0106-0

MISHRA, P.K.K. *et al.* **Animal cloning: Art and ethics.** The Pharma Innovation Journal. Vol. 7(7), p. 839-843, 2018.

MITRAGOTRI, S.; BURKE, P.A.; LANGER, R. **Overcoming the Challenges In Administering Biopharmaceuticals: Formulation And Delivery Strategies.** Nature Reviews Drug Discovery. Vol.13(9), p.655-672, 2014.

MOHAMMADIAN, O. *et al.* **Development of an improved lentiviral based vector system for the stable expression of monoclonal antibody in CHO cells**  
**Development of an improved lentiviral based vector system for the stable expression of monoclonal antibody in CHO cells.** Preparative Biochemistry and Biotechnology, vol. 49, p. 822-829, 2019. Doi: 10.1080/10826068.2019.1621893

MOHIUDDIN M. *et al.* **Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation.** The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. Vol.148(3), p.1106-1114, 2014.

MONZANI, P.S. *et al.* **Breeding of transgenic cattle for human coagulation factor IX by a combination of lentiviral system and cloning.** Genetics and Molecular Research. Vol.12 (3), p. 3675-3688, 2013.

MOTA, F.B.; CASSIOLATO, J.E.; GADELHA, C.A.G. **Futuro da pesquisa, desenvolvimento tecnológico e produção industrial de biofarmacêuticos no Brasil**. RECIIS. Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde (Edição em Português. Online), v. 8, p. 461-477, 2014.

NALDINI, L.; TRONO, D.; VERMA, I.M. **Lentiviral vectors, two decades later**. Science, vol. 353, ed. 6304, p.1101 – 1102, 2016. doi: 10.1126/science.aah6192

NIEMANN, H.; KUES, WA. **Transgenic farm animals: An update**. Reproduction Fertility Development. Vol.19(6), p.762-770, 2007. doi:10.1071/RD07040

NIEMANN, H.; PETERSEN, B. **The Production of Multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation**. Transgenic Research, vol. 25 (3), p. 361-374, 2016. doi:10.1007/s11248-016-9934-8

NIGHTINGALE, S.J. *et al.* **Transient Gene Expression by Nonintegrating Lentiviral Vectors**. Molecular Therapy. Vol. 13 (6), p. 1121-1132, 2006. doi:10.1016/j.ymthe.2006.01.008

OTERO, R.; HERNÁNDEZ, D.; MONTES, D. **Production of Transgenic Bovine Embryos by Microinjection Method of a Lentiviral Vector in Zygotes**. Indian Journal of Science and Technology, Vol. 11(41), p.1-8, 2018. doi:10.17485/ijst/2018/v11i41/131659

PAPA, M. P. *et al.* **Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen**. Theriogenology, vol. 83, p. 107-113, 2015. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.009

PAVLOU, A.; REICHERT, J.; **Recombinant protein therapeutics? success rates, market trends and values to 2010**. Nature Biotechnology. Vol. 22(12), p.1513-1519, 2004.

PERSONS, D.A. **Lentiviral Vector Gene Therapy: Effective and Safe?** Molecular Therapy. Vol. 18(5), p. 861-862, 2010.

PFEIFER, A.; HOFMANN, A. **Lentiviral transgenesis**, in: Gene knockout Protocols. Vol 530, P.391-405. 2009. Doi:10.1007/978-1-59745-471-1\_21

PICANCO-CASTRO, V. *et al.* **Production of Recombinant Therapeutic Proteins in Human Cells: Current Achievements and Future Perspectives.** Protein & Peptide Letters. Vol. 20(12), p.1373-1381, 2013.

PINNAPUREDDY, A. *et al.* **Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease.** Orphanet Journal of Rare Diseases. Vol.10(1), 2015.

PROUDFOOT, C.; LILICO, S.; TAIT-BURKARD, C. **Genome editing for disease resistance in pigs and chickens.** Animal Frontiers, vol. 9, n. 3, p. 6-12, 2019. doi:10.1093/af/vfz013

PU, X.; YOUNG, A.P.; KUBISCH, H.M.; **Production of transgenic mice by pronuclear microinjection.** Methods Molecular Biology. Vol.1874, p.17-41, 2019. Doi:10.1007/978-1-4939-8831-0\_2

QIAN, X. *et al.* **Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice.** Scientific Reports. Vol.4 (6465), 2014.

QUINTANA-BUSTAMANTE, O. *et al.* **Gene editing of PKLR gene in human hematopoietic progenitors through 5' and 3' UTR modified TALEN mRNA.** PLoS ONE, vol.14, p. 1-20, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223775>

REARDON, S. **Gene-editing record smashed in pigs.** Nature. 2015.

RÉMY, S. *et al.* **Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals.** Transgenic Research. Vol. 19, p. 363-71, 2010.

SÁNCHEZ-VILLALBA, E. *et al.* **Improved exogenous DNA uptake in bovine spermatozoa and gene expression in embryos using membrane destabilizing agents in ICSI-SMGT.** Zygote. P. 1-6. 2018. Doi: 10.1017/S0967199417000727

SARKIS C. *et al.* **Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo.** PNAS. Vol. 103, n. 47, p. 1-6, 2006. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606197103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606197103)

SCHEENEN, W. *et al.* **Using Transgenic Animal Models in Neuroendocrine Research.** Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.1163(1), p.296-307, 2009.

SIMÕES, R. *et al.* **Sperm-mediated gene transfer: effect on bovine in vitro embryo production.** *Zygote*. 2012. Doi: 10.1017/S0967199412000147

TAYLOR, S. **A Practical Approach to RT-qPCR — Publishing Data That Conform to the MIQE Guidelines.** American Biotechnology Laboratory. Vol. 28, n. 3, p. 14-19, 2010.

TABEBORDBAR, M. *et al.* **In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells.** *Science*. Vol. 5177, p. 1-9, 2015.

TENENBAUM, S.A. *et al.* **Evidence of HIV Exposure And Transient Seroreactivity In Archived HIV-Negative Severe Hemophiliac Sera.** *Virology Journal*. Vol.2(1), p. 65, 2005. Doi: 10.1186/1743-422X-2-65

USHIYAMA, A. *et al.* **Comparison of Membrane Characteristics between Freshly Ejaculated and Cryopreserved Sperm in the Chicken.** *The Journal of Poultry Science*, 2016. Doi: 10.2141/jpsa.0160043

VECTOR BUILDER. **Vectorbuilder | Revolutionize Your Cloning Experience.** N.p., 2016. Online. Acessado em: 7 Dec 2016. Disponível em: [vectorbuilder.com](http://vectorbuilder.com)

VOLOBUEVA, A.S.; OREKHOV, A.N.; DEYKIN, A.V. **An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases – focus on atherosclerosis.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 52, p.5-11, 2019. doi:10.1590/1414-431X20198108

XU, W. **Microinjection and Micromanipulation: A Historical Perspective.** In: Liu C., Du Y. (eds) *Microinjection. Methods in Molecular Biology*, vol 1874. Humana Press, New York, NY, 2019.

WANG, X.; MCMANUS, M. **Lentivirus Production.** *Journal of Visualized Experiments*, Vol. 32, e1499, 2009. Doi: 10.3791/1499

WANG, Y. *et al.* **Efficient generation of B2m -null pigs via injection of zygote with TALENs.** *Scientific Reports*. Vol. 6 (38854), p.1-11, 2016. doi:10.1038/srep38854

WANG, Y. *et al.* **Production of Transgenic Mice Through Sperm-Mediated Gene Transfer Using Magnetic Nano-Carriers.** *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 13, p. 1673-1681, 2017. Doi: doi:10.1166/jbn.2017.2456

WAKCHAURE, R. *et al.* **Transgenic Animals: A Review on its Various Dimensions and Applications in Animal Biotechnology**, International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering. Vol.5 (11), 2015.

WALL, R.J.; KERR, D.E.; BONDIOLI, K.R. **Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale**. Journal of Dairy Science. Vol. 80, p. 2213-2224, 1997.

WILMUT, I. *et al.* **Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells**. Nature. Vol. 385, p. 810 – 813, 1997.

WONGSRIKEAO P. *et al.* **Combination of the somatic cell nuclear transfer method and RNAi technology for the production of a prion gene-knockdown calf using plasmid vectors harboring the U6 or tRNA promoter**. Prion. Vol. 5(1), p. 39-46, 2011. DOI: 10.4161/pri.5.1.14075

WRIGHT, D.A. *et al.* **TALEN-mediated genome editing: Prospects and perspectives**. Biochemical Journal. Vol. 462, p. 15–24, 2014. Doi:10.1042/BJ20140295

YUM, S.Y. *et al.* **Efficient generation of transgenic cattle using the DNA transposon and their analysis by next-generation sequencing**. Scientific Reports. Vol. 6, p. 1-12, 2016. Doi:10.1038/srep27185

ZHANG, Y. *et al.* **Production of Transgenic Pigs Mediated By Pseudotyped Lentivirus And Sperm**. PLoS One. Vol. 7(4), 2012.

ZHANG, Y. *et al.* **CRISPR / Cas9 - mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation**. Journal of Cellular Biochemistry. P.1-13, 2018. doi:10.1002/jcb.27474

ZHENG, C. *et al.* **Lentiviral Vectors and Adeno-Associated Virus Vectors: Useful Tools for Gene Transfer in Pain Research**. The Anatomical Record. Vol. 301, p. 825–836, 2018. doi:10.1002/ar.23723