

RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES TRANSGÊNICOS BOVINOS POR MEIO DE  
MICROINJEÇÃO DE VETORES LENTIVIRAIS OU TRANSFERÊNCIA  
NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

O87p  
2012

Otero Arroyo, Rafael José, 1981-

Produção de embriões transgênicos bovinos por meio de  
microinjeção de vetores lentivirais ou transferência nuclear de  
células somáticas / Rafael José Otero Arroyo. – Viçosa, MG,  
2012.

xviii, 81f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 62-77

1. Bovino - Reprodução. 2. Bovino - Transferência de  
embriões. 3. Clonagem. 4. Fertilização in vitro. 5. Reprodução  
animal. 6. Transferência de embriões. 7. Animais transgênicos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

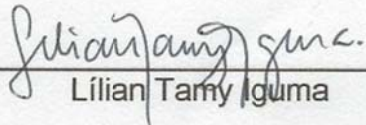
CDD 22. ed. 636.2082

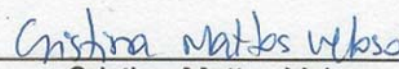
RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO

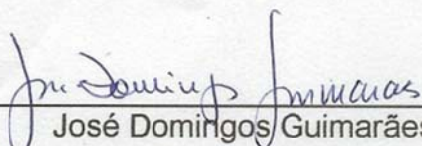
**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES TRANSGÊNICOS BOVINOS POR MEIO DE  
MICROINJEÇÃO DE VETORES LENTIVIRAIS OU TRANSFERÊNCIA  
NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS**


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


APROVADA: 15 de junho de 2012.

  
Lillian Tamy Iguma

  
Cristina Mattos Veloso

  
José Domingos Guimarães  
(Coorientador)

  
Luiz Sérgio de Almeida Camargo  
(Coorientador)

  
Eduardo Paulino da Costa  
(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus, a minha esposa amada Ana Lorena, aos meus pais queridos Rafael José e Maria Teresa, e meus irmãos da alma Jader e Tania, amo todos vocês.

Rafael José Otero Arroyo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pai, por ter me permitido a oportunidade de percorrer o longo caminho da vida, com a sorte de aprender as melhores coisas, pela oportunidade de estar aqui no Brasil, onde aprendi a dar valor às coisas simples, as quais foram fundamentais para uma vida cheia de felicidade e, com toda certeza, hoje sou uma melhor pessoa. Obrigado, Deus.

A minha esposa Ana Lorena, pelo amor, confiança, apoio, força, sempre me compreendendo e aceitando as minhas constantes variações de humor e principalmente minha ausência, e por todo o respeito com que uma mulher pode brindar um homem.

Aos meus pais Rafael José e Maria Teresa, pelo carinho, por todo o apoio e incentivo oferecido na minha trajetória profissional, pelos conselhos do dia a dia que me fizeram ser uma pessoa cada dia melhor.

Aos meus irmãos, Jader e Tania, pela fraternidade, apoio, conselhos, respeito e a paz que vive nossa família.

Ao meu orientador (do Mestrado e do Doutorado), Prof. Dr. Eduardo Paulino da Costa, papai DUDU pelo apoio, paciência no português e dedicação em suas orientações, sem as quais seria impossível esta Tese.

Agradeço profundamente a orientação do Prof. Dr. Luiz Sergio de Almeida Camargo, pelo acolhimento, pela credibilidade, atenção e, principalmente, pela confiança nesta pesquisa. Obrigado pelas oportunidades de treinamento.

Às secretárias do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Rose e Bete, por me ajudar sempre nas horas mais difíceis e, também pelo carinho e amizade. Obrigado Rose. Sempre de bom humor e disposta a ajudar.

Às pesquisadoras Lílian Tamy Iguma, Michele Munk Pereira, Carolina Capobiango R. Quintão. Suas considerações, indicações e questionamentos foram necessários e se transformaram em caminhos trilhados durante todo o processo da pesquisa.

Ao pesquisador Prof. Dr. Jorge R. Toledo Alonso e sua esposa Nataly, obrigado pela disponibilidade e por toda a assistência no fornecimento de suplementos e discussão das técnicas de construção dos vetores lentivirais.

Às minhas colegas da Embrapa, Tochimara Miyauchi (Tochi Tochi) , Thamires Dornelas de Araujo, Gabriela Nardy Quinelato, pela participação ativa na elaboração, execução, discussão e redação deste trabalho, e por toda a amizade que se desenvolveu ao longo destes anos. Obrigado, minhas amigas, sem sua ajuda certamente esta tarefa não seria possível.

Aos colegas de Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, Bruno Campos Carvalho, Joel Vianello, Myro Rodrigues Silva, Savio Cavallari Rodrigues, Natana Chaves Rabelo, Savana Giacomini Brito, Eliza Diniz de Souza, João Gabriel Viana de Grázia, João Vitor, Ana Clara, Carlos Alberto Soares Pain, Miller Pereira Palhão, pelo auxílio na elaboração deste trabalho, amizade, por terem sido tão acolhedores e pelo apoio, que tornaram a adaptação na cidade de Juiz de Fora uma tarefa tão fácil e prazerosa.

Aos profissionais das Seções de Microbiologia do Leite (LML) e Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Sabine Wohlrès Viana, Elisabeth e Karina, pela inestimável colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores José Domingos Guimarães e Cristina Mattos Veloso, que na avaliação final deste trabalho, de forma respeitosa, trouxeram sugestões e recomendações fundamentais para esta pesquisa.

Aos professores Drs. Laércio dos Anjos Benjamin, Tarcízio Antônio Rego de Paula e Abelardo Silva Júnior, pela importante contribuição no plano de qualificação.

Preciso homenagear, ainda, aos amigos, irmãos queridos de longas datas, que todos os dias estão em meus pensamentos e fazem parte de meu coração, e que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu conseguisse completar este percurso. Em nome de Gian Carlos Magalhaes dos Santos, Emílio César Martins Pereira, Felipe Melo Landim, José Rogério Moura de Almeida Neto, Jair Perez Osorio, Gustavo Bruno Mota, agradeço e homenageio a todos. Vou sentir muita saudade meus grandes parceiros.

Aos meus colegas da Colômbia conquistados em Viçosa, Jose Enrique, Alejandro Ruiz, Juan Fernando, Diana, Felipe, Nelson, Carlitos, Jota, Gabriel, que aos poucos, foram saindo do lugar de colegas para ocupar o lugar de grandes amigos fraternos, obrigado pelos momentos que juntos compartilhamos.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela convivência, luta e companheirismo nesses quatro anos de caminhada, especialmente à Sanely, Gustavo Macedo, Emilio Pereira, amigos do dia-a-dia.

Aos meus amigos, professor Joaquim Patarroyo e professora Marlene, pela amizade, atenção, gentileza e pelo acolhimento.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa , pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

À Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, pela oportunidade de treinamento e por possibilitar a realização do experimento.

Consciente de que é impossível listar todos que, de uma forma ou de outra, me acrescentaram conhecimento e experiências essenciais à forma de ver o mundo e nele atuar. Agradeço não somente às pessoas que me ajudaram na elaboração desta pesquisa, mas também àquelas pessoas que, durante toda minha estada aqui no, Brasil, me ajudaram a usufruir uma vida melhor nesta jornada.

**Muito obrigado por tudo, de coração, pela força!**

**Rafael José Otero Arroyo.**

## BIOGRAFIA

**RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO**, filho de Rafael José Otero Vergara e Maria Teresa Arroyo de Otero, nasceu em 13 de Março de 1981, em Montería – Córdoba- Colômbia.

Em 26 de Março de 2004, graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia Pela Universidade de Córdoba- Colômbia.

Em 25 de Fevereiro de 2005, graduou-se em Especialista em Reprodução Bovina Tropical e Transferência de Embriões pela Universidade de Ciências Aplicadas e Ambientais U.D.C.A – Bogotá – Colômbia.

Em 21 de julho de 2008, concluiu-se o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

Em agosto de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, tendo defendido tese em 15 de junho 2012.

Nós somos os arquitetos de nossas vidas,  
temos todas as ferramentas em nossas mãos,  
simplesmente, temos que parar, pensar e decidir,  
como queremos construir essa vida.

**Nunca desista!**

Com força, humildade e determinação sempre,  
chegaremos à nossa meta.

Rafael José Otero Arroyo.

## RESUMO

ARROYO, Rafael José Otero, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Produção de embriões transgênicos bovinos por meio de microinjeção de vetores lentivirais ou transferência nuclear de células somáticas.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

A principal barreira para a produção de animais transgênicos continua sendo a identificação de sistemas mais eficazes de transgenia, incluindo a busca por mecanismos de regulação que otimizem a expressão do transgene. Baseado no princípio da existência de diferentes técnicas para geração de animais transgênicos, o objetivo do presente trabalho foi produzir embriões transgênicos bovinos por meio de microinjeção de vetores lentivirais ou transferência nuclear de células somáticas geneticamente modificadas, cuja finalidade é a geração e seleção precoce de embriões bovinos transgênicos. O experimento foi realizado em duas etapas. A etapa I consistiu no estabelecimento e produção de um vetor lentiviral contendo o gene que codifica a proteína GFP. Já a etapa II foi constituída de três experimentos. No experimento I foi realizada a microinjeção do vetor lentiviral no espaço perivitelineo de ovócitos de bovinos antes da fecundação (T4), obtendo uma taxa de blastocisto de 5,26%, a qual foi menor ( $P < 0,05$ ) quando comparada ao controle (T1) (ovócitos com complexos cumulus-ovócito e sem micromanipulação), controle sem microinjeção (T2) e controle microinjetados com meio Talp (T3). Em todos os embriões microinjetados com o vetor lentiviral foi detectada a expressão do gene repórter nesse caso GFP (da sigla em inglês Proteína Fluorescente Verde) No Experimento II, foi avaliada a microinjeção do vetor lentiviral no espaço perivitelineo de zigotos de bovinos, seis horas pós-fecundação. Os zigotos microinjetados com o vetor lentiviral (T4) apresentaram taxas de blastocistos nos dias sete e oito de cultivo *in vitro* 3,4 e 3,8%, respectivamente. Estes valores encontrados foram inferiores ( $P < 0,05$ ) aos tratamentos controle (T1) (ovócitos com complexos cumulus-ovócito e sem micromanipulação), controle sem

microinjeção (T2) e controle microinjetado com meio Talp (T3). Foi possível evidenciar nos zigotos microinjetados a expressão do gene GFP em Blastocistos no dia sete (75%) e oito (77,7%). No experimento III foi avaliado o efeito da tricostatina A (TSA) sobre a produção de embriões bovinos transgênicos utilizando-se a transferência nuclear com células somáticas modificadas geneticamente por meio de vetores lentivirais. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na taxa de blastocistos de embriões tratados com tricostatina (T1) (18,1%) quando comparada com embriões não tratados (T2) (6,8%). Quando a taxa foi calculada a partir de zigotos clivados, a produção foi superior ( $P<0,05$ ) para os embriões tratados com tricostatina. Em ambos tratamentos, todos os blastocistos gerados expressaram o gene GFP. Deste modo conclui-se que nas condições do presente estudo, a microinjeção do vetor lentiviral nos ovócitos e zigotos seis horas pós-fecundação resultam comprometem as taxas de desenvolvimento embrionário. Eventualmente, a eficácia de tal procedimento foi comprovada uma vez que a microinjeção de vetores lentivirais nos ovócitos e zigotos resultou em uma alta expressão da proteína fluorescente verde GFP. Adicionalmente, observou-se que a TSA melhorou o desenvolvimento de embriões clones gerados de células geneticamente modificadas.

## ABSTRACT

ARROYO, Otero Rafael José, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Production of transgenic bovine embryos by microinjection of lentiviral vectors or somatic cell nuclear transfer.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

In these days, the main barriers for production of transgenic animals are the identification of efficient systems of transgenic, such as different mechanisms on finding gene expression. Based on the idea of searching for different ways of developing transgenic animals, the objective of this research was to produce transgenic bovine embryos using the lentiviral vector of microinjection or nuclear transfers of genetically modified somatic cells, which have the finality of developing and quickly selecting animals from transgenic bovine embryos. This research was conducted in two different stages. Stage I consisted on establishing and producing a lentiviral vector which codified GFP protein. Stage II consisted on conducting three different experiments. On experiment I, a microinjection was developed on the lentiviral vector in the perivitelline space of the bovine oocytes before fecundation (T4), obtaining 5,26 percent of blastocites. When compared with the control (T1) (complex oocytes with "cumulus-oocytes and without manipulation) the percentage was lower ( $P < 0,05$ ), control without microinjection (T2), or a control with microinjections and Talp medium (T3). On all the microinjected embryos with the lentiviral vectors, a gene expression of GFP (Green Fluorescent Protein) was detected. On experiment II, a microinjection of the lentiviral vector on the perivitelline space of the bovine zygote was evaluated six hours after fecundation. The microinjected zygotes with the lentiviral vector (T4), on in vitro cultivars, blastocite rates day seven and day eight, 3,4% and 3,8% respectively. This values were below ( $P < 0,05$ ) in comparison with the control (T1) (complex oocytes with "cumulus-oocytes and without manipulation), control without microinjection (T2), or a control with microinjections and Talp medium (T3). It was possible to recognize the microinjected zygotes with the GFP gene on

blastocites on day seven (75%) and day eight (77,7%). On experiment III, the triconstatitina A (TSA) was evaluated producing the transgenic bovine embryos using a nuclear transfer with genetically modified somatic cells with lentiviral vector. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in blastocyst rate of embryos treated with trichostatin (T1) (18.1%) when compared with untreated embryos (T2) (6.8%). When the rate was calculated from cleaved zygotes, production was higher ( $P < 0.05$ ) for embryos treated with trichostatin. In both treatments, all generated blastocysts expressed the GFP gene. In this research the microinjection with the lentiviral vector on oocytes and zygotes after six hours later post-fecundation affected the rates of embryo development. It was proved that the microinjection using the lentiviral vectors on oocytes and zygotes cause a higher expression of green fluorescent protein (GFP). Additionally, the TSA contributed with a better development of cloned embryos on genetically modified cells.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1</b>	Injeção Subzonal.....	10
<b>FIGURA 2</b>	Estrutura do Retrovírus.....	12
<b>FIGURA 3</b>	Esquema representativo da organização do genoma dos retrovírus.....	13
<b>FIGURA 4</b>	O ciclo de vida do retrovírus.....	14
<b>FIGURA 5</b>	Produção do vetor Lentiviral.....	16
<b>FIGURA 6</b>	Injeção subzonal do vetor lentiviral no ovócitos.....	33
<b>FIGURA 7</b>	Injeção subzonal do vetor lentiviral no zigoto 6 horas pós-fecundação.....	37
<b>FIGURA 8</b>	Eletroforese do plasmídeo pLGW expandido.....	44
<b>FIGURA 9</b>	Análise da fluorescência da GFP, na linha celular HEK-293.....	46
<b>FIGURA 10</b>	Embriões de bovinos microinjetados com vetor lentiviral.....	50
<b>FIGURA 11</b>	Embriões de bovinos microinjetados com vetor lentiviral.....	52
<b>FIGURA 12</b>	Embriões de bovinos microinjetados com vetor lentiviral.....	55
<b>FIGURA 13</b>	Fibroblastos de bovinos modificados geneticamente com GFP.....	57
<b>FIGURA 14</b>	Embriões clones tratados com tricostatina e expressando a proteína GFP.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Produção de embriões transgênicos, através do método de microinjeção de vetores lentivirais nos ovócitos maduros de bovinos.....	47
<b>TABELA 2-</b> Produção de embriões transgênicos, através do método de microinjeção de vetores lentivirais nos zigotos 6 horas pós-fecundação.....	51
<b>TABELA 3-</b> Desenvolvimento in vitro de embriões clones transgênicos tratados com inibidor de histona deacetilase (tricostatina) nas 11-12 primeiras horas após reconstrução.....	58

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AP	Ativação partenogenética
avGFP	Aequorea victoria, green fluorescent protein
BHI	Brain Heart Infusion
BLD7	Blastocistos no dia 7 de cultivo
BLD8	Blastocisto no dia 8 de cultivo
CaPO <sub>4</sub>	Fosfato de cálcio
CCO	complexos cumulus-ovócitos
cDNA	DNA complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
eGFP	Enhanced Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde aprimorada)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
gene env	Envelope glycoprotein
gene gag	Group-specific-AntiGen
gene pol	RNA-dependent DNA polymerase-reverse transcriptase
GFP	Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)
HEK-293F	Células embrionárias de rim humano

HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection (injeção intracitoplasmática de espermatozóides)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
IETS	International Embryo Transfer Society (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões)
kb	kilobase
LTR	Long Terminal Repeats (sequências longas repetidas)
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Mo-MLV	Vírus da leucemia murina Moloney
NaCl	Cloreto de sódio
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
pb	Pares de base
PEI	Poliétilenoimina
PIC	Pre-integration complex (complexo de pré-integração)
pl.	Picolitro
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RNA <sub>m</sub>	Ribonucleic acid messenger (ácido ribonucleico mensageiro)
rpm	Rotações por minuto
RVG	Ruptura de vesícula germinativa
SFB	Soro fetal bovino
SIN	Self Inactivating (vetores auto-inativados)

SMGT	Sperm Mediated Gene Transfer (Transferência Gênica Mediada por espermatozoides)
SPTZ	Espermatozóides
SV40	Vírus símio 40
TCM 199	Tissue Culture Medium 199
TGME	Transferência gênica mediada por espermatozoides
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TSA	Tricostatina A
UV	Luz Ultravioleta
VSV-G	Vírus da estomatite vesicular
ZP	Zona Pelúcida

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	viii
	<b>ABSTRACT</b> .....	x
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1	Métodos para Transferência de Gene.....	6
2.1.1.	Microinjeção Pronuclear.....	6
2.1.2.	Transferência Gênica Mediada por Espermatozóides (SMGT).....	6
2.1.3.	Vetores Retrovirais.....	7
2.1.3.1	Lentivírus.....	10
2.1.3.2	Estrutura genômica dos retrovírus.....	11
2.1.3.3	Ciclo dos retrovírus.....	13
2.1.3.4.	Construção de vetores lentivirais.....	15
2.1.4	Transferência Gênica em Células Somáticas.....	19
2.2	Proteína Fluorescente Verde (GFP) Gene Repórter .....	22
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	Etapa I.....	25
3.1.1	Produção do Vetor Lentiviral.....	25
3.1.1.1	Preparo e cultivo das células a serem utilizadas na produção dos vetores lentivirais.....	25
3.1.1.2	Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial.....	26
3.1.1.3	Montagem do vetor lentiviral.....	28
3.2	Etapa II.....	30
3.2.1	Produção de embriões transgênicos bovinos com vetores lentivirais.....	30
3.2.1.1	Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos.....	30
3.2.1.2	Maturação <i>in vitro</i> .....	31
3.2.2	Experimento I – Microinjeção dos ovócitos com vetor lentiviral.....	31
3.2.2.1	Microinjeção dos ovócitos pré-fecundação com vetor lentiviral.....	32
3.2.2.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	33
3.2.2.3	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	34
3.2.2.4	Avaliação do desenvolvimento embrionário.....	34

3.2.2.5	Avaliação da expressão do GFP.....	35
3.2.3	Experimento II – Microinjeção dos zigotos seis horas pós-fecundação com vetor lentiviral.....	35
3.2.3.1	Fecundação <i>in vitro</i> .....	36
3.2.3.2	Microinjeção dos zigotos seis horas pós-fecundação com vetor lentiviral.....	36
3.2.3.3	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	37
3.2.3.4	Avaliação da taxa de clivagem e taxa de blastocistos.....	38
3.2.3.5	Avaliação da expressão do GFP.....	38
3.2.4	Experimento III - Efeito da tricostatina A em embriões clones modificados geneticamente com GFP.....	38
3.2.4.1	Estabelecimento de linhagens de células somáticas modificadas geneticamente.....	39
3.2.4.2	Maturação <i>in vitro</i> .....	40
3.2.4.3	Transferência nuclear com células somáticas.....	40
3.2.4.4	Enucleação, reconstrução e fusão.....	40
3.2.4.5	Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	41
3.2.4.6	Tratamento dos embriões com tricostatina A.....	41
3.2.4.7	Ativação partenogenética.....	41
3.2.4.8	Avaliação do desenvolvimento embrionário.....	42
3.2.4.9	Avaliação da expressão do GFP.....	42
3.3	Análise estatística.....	43
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
	<b>ANEXOS</b> .....	78

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento, aprimoramento e uso de biotécnicas aplicadas à reprodução animal são indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. Neste contexto, algumas biotécnicas apresentam grande disseminação comercial e importância econômica, como a inseminação artificial, a transferência, criopreservação e produção *in vitro* de embriões. Entretanto, a clonagem ainda inicia sua inserção no mercado, enquanto que a transgenia permanece mais restrita a centros de pesquisa (VISINTIN et al., 2008).

Historicamente, o melhoramento genético tem sido um componente importante para o progresso dos animais domésticos. O objetivo desta ferramenta é aumentar a frequência dos genes de efeitos desejáveis, visando otimizar a produção dos animais de interesse para o homem. Embora essa técnica seja bastante eficaz para melhorar as características de interesse produtivo, como leite e carne, o ganho entre as gerações é lento.

Recentemente, os avanços na tecnologia do DNA recombinante têm possibilitado a obtenção de resultados em uma única geração, bem como na geração de novos genótipos, ao inserir, excluir ou modificar o genoma de uma única geração (EYESTONE, 1999; MOURA et al., 2011). O trabalho pioneiro conduzido por Gordon et al. (1980) demonstrou que o DNA do vírus símio 40 (SV40) heterólogo ao ser microinjetado em prónucleos de zigotos murinos, integrou-se aos cromossomos, sendo capaz de replicar e ser encontrado nos tecidos da prole. A estes animais geneticamente modificados deu-se o nome de transgênicos. Concomitantemente, outros laboratórios repetiram esta técnica, sendo que a microinjeção em pró-núcleos foi adotada como método de escolha para a geração de camundongos transgênicos (PALMITER et al., 1982). Desde então, substanciais progresso e conquistas estão sendo obtidos nas pesquisas com animais transgênicos (FAN et al., 2003).

Neste contexto, se insere uma das aplicações da tecnologia do DNA recombinante, conhecida popularmente como engenharia genética. Ela possibilita o isolamento de um gene de um dado organismo e sua transferência

para outro, transpondo barreiras de cruzamento entre os reinos vegetal, animal, protista e fungi. O resultado é um indivíduo geneticamente igual ao utilizado para receber a molécula de DNA recombinante. Contudo, este indivíduo possuirá uma nova característica genética, proveniente da mesma espécie ou de outra espécie (AZEVEDO et al., 2000). O termo transgenia é definido como a introdução, alteração ou inativação de uma sequência gênica no genoma de organismos pluricelulares, sendo estas mudanças capazes de serem transmitidas à progênie do indivíduo resultante (RULICKE et al., 2007).

Os animais transgênicos podem ser utilizados para a produção de proteínas humanas recombinantes, xenotransplantes e estudos de doenças genéticas humanas (KUES et al., 2011). No setor produtivo, esta técnica atende a programas de melhoramento genético com rápida multiplicação de animais com características desejáveis (NEVES et al., 2010). As aplicações práticas dos transgênicos na produção animal incluem a melhoria na produção e composição do leite, aumento na taxa de crescimento, melhoria na composição de carcaça, aumento na resistência a doenças, no desempenho reprodutivo e na prolificidade (WHEELER, 2007). Ainda segundo Houdebine (2000), a transgenia tem sido uma ferramenta utilizada na produção de proteínas recombinantes no leite de espécies animais, como cabras, ovelhas, porcas e vacas. Assim, essa ferramenta contribui para o uso de animais para a produção de princípios farmacológicos de alto valor no mercado internacional, em larga escala e baixo custo (RUMPF e MELO, 2005).

Dentre as diferentes biotécnicas de manipulação, vários métodos podem ser utilizados para geração de animais transgênicos. Estas podem ser através da transferência de vetores virais ou de DNA mediada por espermatozoides ou por transferência nuclear a partir de células somáticas transfectadas (TNCS) (ROBL et al., 2007). Para esta última técnica, fibroblastos cultivados *in vitro* são modificados geneticamente e posteriormente fusionados com ovócitos receptores enucleados (MCCREATH et al., 2000). No esforço de melhorar as taxas de embriões transgênicos por TNCS, um estudo utilizou um agente químico inibidor da histona deacetilase chamado tricostatina (TSA) em embriões recém-construídos (IWAMOTO et al., 2007). A acetilação de histonas

do DNA está associada ao relaxamento da estrutura da cromatina, tornando-a mais permissiva à transcrição e replicação, enquanto a deacetilação de histonas tem efeito oposto. No entanto, a cromatina de ovócitos maturados e zigotos possui baixo nível de acetilação, a cromatina de embriões em estágios de pré-implantação apresentam níveis de acetilação mais elevados (SARMENTO et al., 2004). Este fato parece estar associado a um novo padrão de expressão embrionária, diferente daquele observado nos gametas. Dentre as vantagens da TSA, pode-se destacar sua reduzida toxicidade e a necessidade de baixas concentrações para indução do efeito desejado (JOHNSTONE, 2002).

Outra metodologia utilizada em transferência gênica são os vetores retrovirais, devido principalmente a alta eficiência de transdução obtida com estes vetores para introduzir genes exógenos (ROMANO et al., 2000). Os lentivírus fazem parte da família dos retrovírus, mas diferem deles na maneira pela qual infectam as células, sendo classificados como retrovírus complexos (WHEELER, 2008). Estes vírus possuem a habilidade de infectar células quiescentes ou que estejam em fase de divisão (BUKRINSKY et al., 1993 ; NALDINI, 1998; MIYOSHI et al., 1999). Recentemente, o uso dos lentivírus para introdução do transgene tem se consolidado como um processo mais eficiente. A transgênese lentiviral é considerada menos invasiva aos embriões, e tecnicamente menos exigente. Além disso, vetores lentivirais podem infectar uma grande variedade de células de vertebrados, tornando potencialmente útil para criar animais transgênicos em numerosas espécies, incluindo aves, gatos, porcos e primatas não-humanos (PFEIFER, 2004). A transdução lentiviral é altamente estável e não evidencia o efeito indesejado de silenciamento gênico (PFEIFER et al., 2002).

Durante os procedimentos de incorporação de genes no genoma celular, algumas proteínas fluorescentes, como a GFP, também conhecida como eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) tem sido amplamente utilizadas como um gene repórter. Isto ocorre uma vez que podem ser identificadas após exposição à luz ultravioleta, na expressão em células vivas (CHALFIE et al.,

1994; PRASHER, 1995), indicando os embriões transgênicos antes de serem transferidos para uma receptora (SÁNCHEZ et al., 2011).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar métodos de microinjeção de um vetor lentiviral e de transferência nuclear de células somáticas modificadas geneticamente com vetores lentivirais, visando a geração e seleção precoce de embriões bovinos transgênicos.

## 2. - REVISÃO DE LITERATURA

Os Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) ou transgênicos são organismos vivos (plantas, animais ou bactérias) (CLARK, 2002) que por ação do homem tenham sequências de DNA de outra espécie inserida no seu genoma (RUMPF e MELO, 2005). O objetivo desta ferramenta é proporcionar novas características a produção animal ou vegetal, tornando-os mais eficientes e competitivos (CLARK, 2002).

O gene a ser introduzido consiste basicamente de uma construção de DNA contendo uma região de promotor e a região que codifica para a proteína de interesse. Esta região de DNA é normalmente chamada transgene e pode ser de outro animal da mesma espécie ou de uma bactéria ou planta (FELMER, 2004). A inserção deste gene pode ser aleatória, em qualquer parte do genoma ou pode ser dirigida para um sítio específico do genoma da célula, o que é chamado de recombinação homóloga. O tipo de integração dependerá da necessidade de se dispor do transgene. A recombinação homóloga é utilizada quando se pretende bloquear um gene, enquanto que na inserção aleatória, o gene introduzido é expresso na célula (LUZARDO, 2010).

O DNA exógeno constitui-se numa macromolécula que não consegue entrar facilmente na membrana celular e integrar-se no genoma celular. Por isso, devem ser implementados métodos mecânicos ou físico-químicos para permitir a incorporação de DNA do exógeno. Por outro lado, para ser transgênico, um animal deve apresentar o DNA exógeno em todas as suas células, incluindo os gametas, para permitir a transmissão à progênie. O DNA exógeno deve, portanto, estar presente em todas as células do embrião, independente do método utilizado para a transferência gênica (HOUDEBINE, 2005; COLLARES, 2007).

## **2.1 Métodos para Transferência de Gene**

Existem várias técnicas para a produção de animais transgênicos. A escolha vai depender do tipo de integração genética pretendida e da capacidade de cada laboratório (LUZARDO, 2010).

### **2.1.1 Microinjeção Pronuclear**

Até recentemente, a microinjeção de DNA recombinante no pronúcleo de um ovócito fertilizado permaneceu como método de escolha para gerar um animal transgênico. Este método inicialmente foi desenvolvido em camundongos e depois esta tecnologia foi logo aplicada a outros mamíferos como, coelhos, suínos, ovinos e bovinos (HOUEBINE, 2002). A microinjeção envolve a injeção de vários milhares de cópias de DNA em pronúcleos de zigotos. Contudo, este método apresenta problemas que incluem sua baixa eficiência (KUES et al., 2004). Tal fato está relacionado à baixa frequência de integração do DNA, ocorrendo em 1 a 4% dos embriões injetados (WALL, 1996). Embora este procedimento seja utilizado, é ineficiente uma vez que a microinjeção é seguida por uma integração mal controlada de DNA, que conduz a uma variação de rendimento de animais transgênicos e imprevisível expressão dos transgenes (PURSEL et al., 1993; WALL, 1996; HOUEBINE, 2002b).

### **2.1.2 Transferência Gênica Mediada por Espermatozoides (SMGT)**

Os métodos baseados no uso de espermatozoides são conhecidos como espermatotransgênese ou SMGT (*Sperm Mediated Gene Transfer*) (LAVITRANO et al., 1989; COLLARES et al., 2005). Este método é uma poderosa ferramenta para a transgenia animal e a biotecnologia nas espécies em que a reprodução ocorre por gametas, principalmente naquelas em que as técnicas convencionais apresentam baixa eficiência, como suínos e bovinos (FEITOSA et al., 2005). Para esta técnica, a membrana dos espermatozoides é

permeabilizada e incubada com as moléculas de DNA, que contêm o transgene, de modo que a cabeça do espermatozóide interage com o DNA e atua como portador do transgene. A injeção espermática intra-citoplasmática (ICSI) no ovócito maturo permite que o transgene seja incorporado no genoma embrionário por meio do mecanismo de reparação do DNA (MOISYADI et al., 2009).

Esse método apresentou eficiência em peixes, aves, camundongos, coelhos e bovinos (COLLARES et al., 2007). A eficiência de SMGT parece depender, em grande parte, das características específicas do doador de espermatozóide, mostrando uma grande variação entre espécies (SPADAFORA, 2007). Outro entrave seria a resistência do ovócito, razão pela qual é indicada somente para espécies cujos ovócitos são resistentes à manipulação e à injeção. (LACHAM-KAPLAN e TROUNSON, 1995). Claramente, são necessárias mais investigações, já que sua eficiência precisa ser melhorada consideravelmente (KANG et al., 2001; WHEELER et al., 2008).

### **2.1.3 Vetores Retrovirais**

Os vírus também podem ser usados para carregar o DNA para dentro das células. Os retrovírus são os mais adequados para uma transformação estável de células de mamífero, já que o DNA viral é eficientemente integrado no genoma hospedeiro e não provoca a lise celular (WATSON, 1992). O sucesso em inserir DNA exógeno de modo experimental só foi possível graças a estudos anteriores feitos por Jaenisch e Mintz (1974), que injetaram DNA do vírus SV40 em embriões de camundongo. Entretanto, esses camundongos não incorporaram o DNA de SV40 em suas células germinativas (ROBL et al., 2007; PARK, 2007). Contudo, estudos posteriores alcançaram a incorporação na linhagem germinativa, microinjetando vírus da leucemia murina Moloney (Mo-MLV) em embriões murinos, resultando na primeira linhagem de camundongos transgênicos (JAENISCH, 1976; WHEELER et al., 2008).

No entanto, os experimentos iniciais usando vetores retrovirais em embriões bovinos resultaram em um sucesso limitado, já que foram utilizados

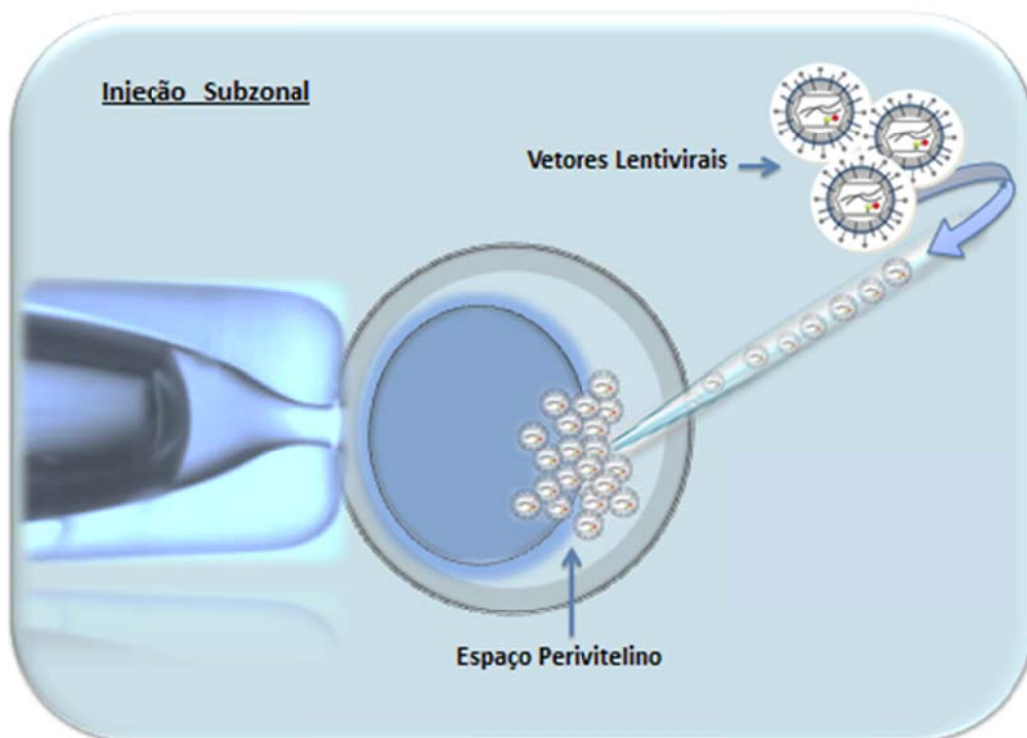
retrovírus simples ou protótipo. Neste contexto, ocorriam variações, uma vez que estavam sujeitos a modificações epigenéticas e sua expressão podia ser silenciada durante a embriogênese (JAHNER e JAENISCH, 1985; CHAN et al., 1998; WALL, 2002). Devido a isso, a transfecção na fase inicial de desenvolvimento embrionário com vetores retrovirais resultou numa integração retardada e não homogênea nos tecidos, fato que afetou significativamente a eficiência do método (HASKELL e BOWEN, 1995). Estudos posteriores demonstram que outro tipo de vetor retroviral, derivado a partir de lentivírus, oferece outra forma de abordagem para o transporte de material genético. Deste modo, estes vetores passaram a ser intensamente pesquisados para essa finalidade (WANG et al., 2010). Estes têm se mostrado altamente eficazes para introduzir genes exógenos em ovócitos e zigotos (KUES et al., 2011). Hofmann et al. (2004) conseguiram a geração de 100% de bezerros transgênicos expressando eGFP por meio da microinjeção de vetores lentivirais nos ovócitos bovinos. Porém, a técnica não foi bem sucedida com a transfecção lentiviral nos zigotos bovinos.

Os primeiros animais transgênicos gerados utilizando a tecnologia de vetores lentivirais foram desenvolvidos por Lois et al. (2002). Trabalhando com camundongos e ratos, estes autores mostraram que a injeção de vetores lentivirais derivados do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), no espaço perivitelino de ovócitos fertilizados poderia aumentar significativamente a eficiência de produção de animais transgênicos. Demonstraram, ainda, que o transgene incorporado pelo vetor lentiviral foi transmitido para a prole (geração F1) através da linha germinal e sua expressão foi detectada nesta geração (PFEIFER, 2004; HIRIPI et al., 2010). Similarmente, um estudo feito por Wang et al. (2010), utilizando ratos transgênicos como modelo experimental, provaram a integração do eGFP lentiviral pelo menos durante sete gerações de transmissão da linha germinativa.

Quando comparada à técnica de microinjeção de DNA clássica, a transferência de genes lentiviral resulta numa taxa de quatro a oito vezes mais elevada de animais transgênicos por embrião tratado (HOFMANN et al., 2006). Além disso, mais de 90% da geração F0 de animais são capazes de expressar

o transgene (LOIS et al., 2002; PFEIFER et al., 2002), provando ser uma técnica altamente eficiente em camundongos e ratos. Esta técnica chega a apresentar uma eficiência de transgênese entre 60 e 80%, podendo ser utilizada em outras espécies (LOIS et al., 2002; PFEIFER et al., 2002), como galinhas (MCGREW et al., 2004 ; CHAPMAN et al., 2005), macacos (CHAN et al., 2001) e animais de grande porte. Em suínos, demonstrou uma eficácia de 70% (HOFMANN et al., 2003; WHITELOW et al., 2004) e em bovinos, atingiu níveis de eficiência na geração de transgênicos de até 100% (HOFMANN et al., 2004).

No entanto, ainda existem algumas limitações à ampla utilização de lentivirais, especialmente quando se faz necessária a utilização de altos títulos virais. Um dos entraves para a utilização do lentivírus seria a composição do embrião de mamífero, uma vez que o lentivírus deve ultrapassar a zona pelúcida (ZP) do embrião, matriz extracelular glicoprotéica que confere proteção exterior ao embrião (MIAO et al., 2011), inclusive contra agentes infecciosos (VAN SOOM et al., 2010). No entanto, neste caso, a ZP acaba atuando como barreira física que evita a penetração de lentivírus (MIAO et al., 2011). Deste modo, o método preferido é a injeção de partículas virais para dentro do espaço perivitelino (injeção subzonal) (Figura 1) (LOIS et al., 2002; PFEIFER, 2004), permitindo que o vírus consiga superar a membrana do ovócito ou o zigoto. Considerando o pequeno volume do espaço perivitelino entre a membrana citoplasmática e a zona pelúcida, apenas 50-100 pl. de vetor lentivírus devem ser injetados (LOIS et al., 2002; RITCHIE et al., 2007). Embora sejam necessários equipamentos para injeção subzonal (microscópio invertido, manipuladores e microinjetor), este procedimento é considerado bastante eficiente. Isto porque a técnica da retirada da ZP do zigoto, na qual se co-incuba uma única célula embrionária com os vetores lentivirais, exige elevados títulos de lentivírus. Este fato tem a desvantagem de atrasar e reduzir as taxas de desenvolvimento embrionário, acarretando um efeito negativo na implantação embrionária (LOIS et al., 2002; PFEIFER, 2004; MIAO et al., 2011).



**Figura 1. Injeção Subzonal.** Geração de animais transgênicos por injeção de lentivirais no espaço perivitelino (injeção subzonal) de zigotos. A ponta do capilar avança para dentro do espaço perivitelino, situada entre a zona pelúcida e da membrana citoplasmática do zigoto. Fonte: adaptado de Pfeifer (2004).

### 2.1.3.1 Lentivírus

Os lentivírus pertencem à família *Retroviridae* e compreendem vírus que utilizam a RNA-dependente-DNA-polimerase, ou seja, uma transcriptase reversa (TR) (COFFIN et al., 1997). Esta propriedade dos lentivírus resulta na integração permanente do transgene no cromossomo do hospedeiro (VAN DEN HAUTE et al., 2003; KE et al., 2006; MOFFAT et al., 2006).

De acordo com a classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*), existem sete gêneros dentro família *Retroviridae*: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* (Oncovírus), *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*. Os três primeiros são classificados como retrovírus simples ou protótipos, e os últimos como retrovírus complexos (COFFIN et al., 1997; GOFF, 2004; LEROUX et al., 2008). Lentivírus têm sido isolados de ovinos (Maedi-Visna vírus - MVV), caprinos (artrite caprina viral / encefalite - CAEV),

bovinos (vírus da imunodeficiência bovina - BIV), equinos (vírus da anemia infecciosa equina EIAV), felinos (vírus da imunodeficiência felina - FIV), macacos (vírus da imunodeficiência símia - SIV) e humanos (vírus da imunodeficiência humana - HIV). O tipo HIV-1 é atualmente o mais estudado (PFEIFER, 2004; GOMEZ et al., 2010).

Os vetores lentivirais têm sido desenvolvidos a partir do genoma de HIV-1, apresentando a característica de não possuírem as sequências correspondentes aos genes virais que conferem patogenicidade, a fim de minimizar o risco de formação do vírus de replicação competente (NALDINI et al., 1996). Para isso, é importante a eliminação de genes dispensáveis à transferência gênica durante o processo de montagem do lentivector, como o gen Vpu, responsável pelo brotamento do vírus. A eliminação desses genes torna o vetor mais seguro, por reduzir a sua quantidade de genes virais. Além disso, genes estruturais e de envelope são separados do vetor de transferência (diferentes plasmídeos) para dificultar a recombinação do vírus (TENÓRIO et al., 2008). A inativação das regiões promotoras no genoma viral (LTR 5') é uma condição desejável, uma vez que torna o vetor auto inativante, incapaz de produzir um transcrito completo, competente para encapsidação (PARK, 2007; TENÓRIO et al., 2008). Nos últimos anos, grandes esforços estão sendo realizados para tentar apagar mais sequências dos tipos selvagens de HIV na transferência lentiviral (integração) e ao mesmo tempo melhorar os títulos dos vetores e a expressão dos transgenes (OH et al., 2007)

### **2.1.3.2 Estrutura genômica dos retrovírus**

Estruturalmente, os retrovírus são um complexo de formato esférico, constituído de uma membrana lipídica, denominada envelope, que recobre o capsídeo (TURNER et al., 1999). Essa estrutura é composta por proteínas responsáveis pelo reconhecimento e interação com proteínas da célula hospedeira alvo (TENÓRIO et al., 2008). O envelope se apoia no capsídeo através da matriz (MA), e o capsídeo, além de fornecer a integridade viral, confere a simetria estrutural (COFFIN, 1996) (Figura 2).

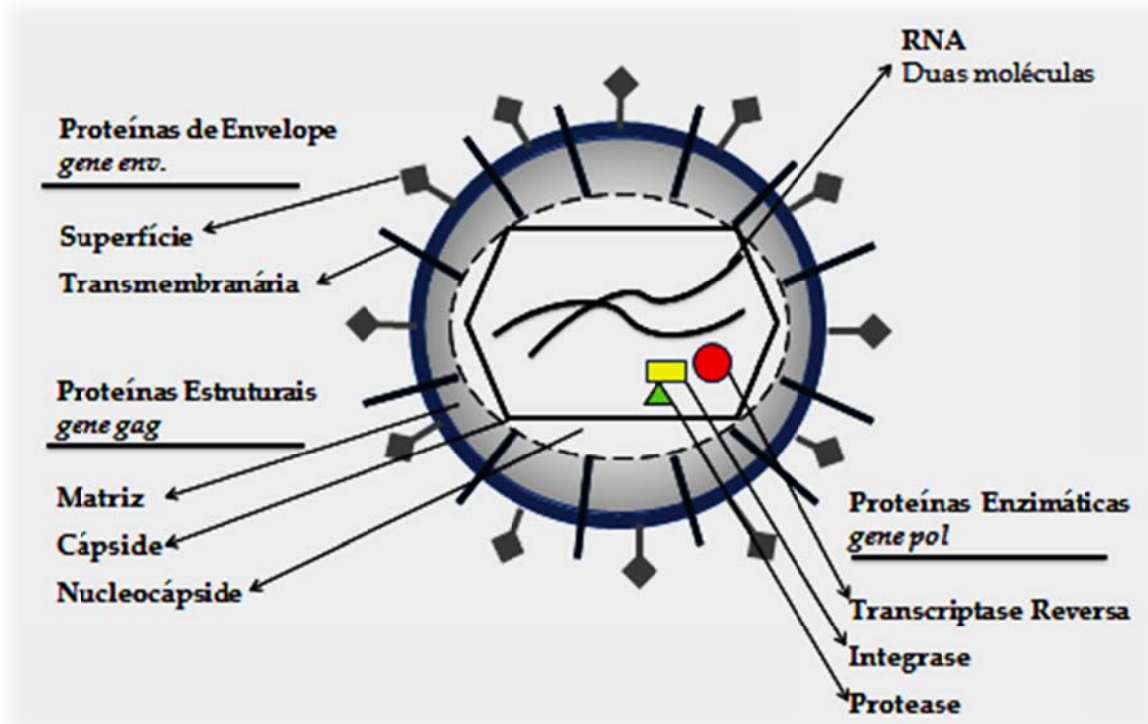


Figura 2. Estrutura do Retrovírus.

Fonte: adaptado de Leroux (2008).

Os retrovírus apresentam um genoma que codifica três genes comuns, *gag*, *pol* e *env*. O *gene gag* (*Group-specific-AntiGen*) codifica as três proteínas virais estruturais fundamentais: a matriz (MA), a proteína da cápside (CA) e a nucleocápside (NC) (JARRETT, 1999). O *gene pol* (*RNA-dependent DNA polymerase-reverse transcriptase*) codifica as enzimas envolvidas na replicação e integração viral, entre elas a transcriptase reversa (RT), a integrase (IN) e a protease (PR). As duas últimas são relacionadas principalmente à integração no genoma hospedeiro (BUCHSCHACHER, 2001). A RT é uma polimerase de DNA dependente de RNA, envolvida na replicação do RNA viral e essencial para a conversão de RNA viral em DNA (LEROUX et al., 2008). Por fim, o *gene env* (*envelope glycoprotein*) codifica as glicoproteínas do envelope (*env*), a glicoproteína de superfície (SU) e a proteína transmembranar (TM) que são glicosiladas na maioria dos retrovírus (JARRETT, 1999; BUCHSCHACHER, 2001).

A estrutura geral de qualquer retrovírus contém, também, outros elementos em *cis*. Estes incluem: *Long Terminal Repeats* (LTR), localizados nas duas extremidades do genoma. Os LTR são constituídos de três regiões, U3, R e U5, as quais são necessárias tanto para integração na célula

hospedeira quanto para definição do início e fim da transcrição (COFFIN et al., 1997; TENÓRIO et al., 2008). Muitos elementos necessários à transcrição do provírus (promotores e intensificadores) estão localizados na região U3 (LOIS et al., 2002; PRIVATO, 2005 ) (Figura 3).

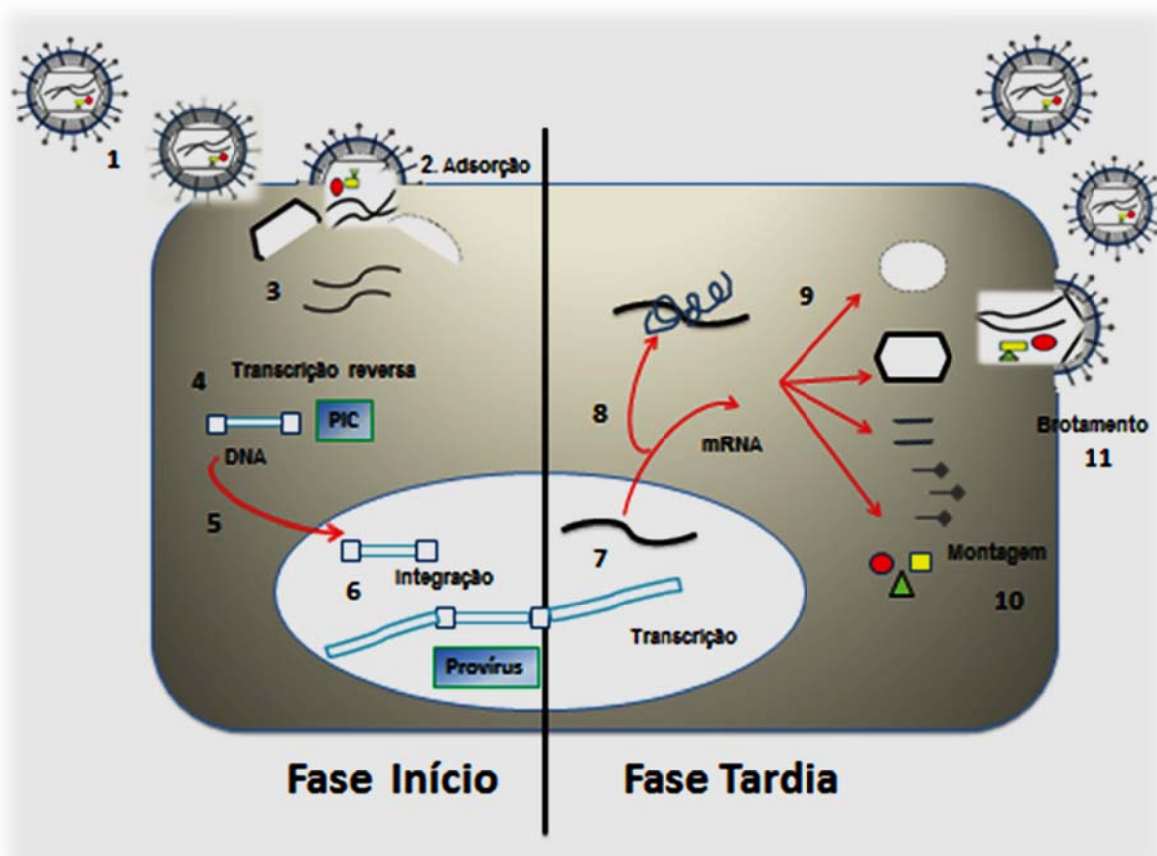


**Figura 3. Esquema representativo da organização do genoma dos retrovírus.** Genoma do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). Este vírus apresenta DNA genômico composto por genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, que são comuns a todos os retrovírus, além de dois genes regulatórios (*tat* e *rev*) e quatro acessórios (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*). Fonte: adaptado de Gomez et al. (2010).

### 2.1.3.3 Ciclo dos retrovírus

O ciclo de vida retroviral é tradicionalmente dividido em duas fases distintas. A fase de início ou fase precoce inicia com a entrada do vírus na célula até a integração do cDNA viral no genoma do hospedeiro. A fase tardia tem início na transcrição do RNA viral e termina na libertação de partículas virais infecciosas (GOFF, 2004; NISOLE et al., 2004) (Figura 4). Na fase precoce, o vírus liga-se aos receptores na superfície das células hospedeiras suscetíveis. Após a fusão da membrana, o núcleo viral entra no citoplasma (RUSMEVICHIENTONG et al., 2010). Uma vez no citoplasma da célula hospedeira, o capsídeo é destruído, para que inicie o processo da retrotranscrição ou transcrição reversa, no qual o RNA fita simples é transformado em DNA fita dupla, através da transcriptase reversa, processo este que normalmente começa logo após a entrada do núcleo do vírion no citoplasma da célula infectada (DE SOULTRAIT et al., 2002). Em seguida, ocorre a formação de um complexo de pré integração (*pre-integration complex* - PIC), capaz de interagir com proteínas citoplasmáticas e carioplasmáticas da célula hospedeira (TENÓRIO et al., 2008). O PIC da maioria dos retrovírus é incapaz de penetrar núcleos intactos e deve, portanto, aguardar para a repartição da

membrana nuclear, que ocorre durante a mitose (ROE et al., 1993; LEWIS et al., 1994). Conseqüentemente, um retrovírus simples, como o vírus da leucemia murina de Moloney (MLV), não pode atravessar a membrana nuclear e, por conseguinte, a infecção é restrita à célula hospedeira em divisão. Em contraste, vetores lentivirais podem ser importados através do poro nuclear e podem, portanto, também infectar células que não estejam em fase de divisão (BLESCH, 2004; NISOLE et al., 2004). Após esse processo, o provírus é integrado aparentemente, de forma aleatória no genoma da célula hospedeira, através da ação da integrase e de outras proteínas celulares (TENÓRIO et al., 2008).



**Figura 4. O ciclo de vida do retrovírus.**

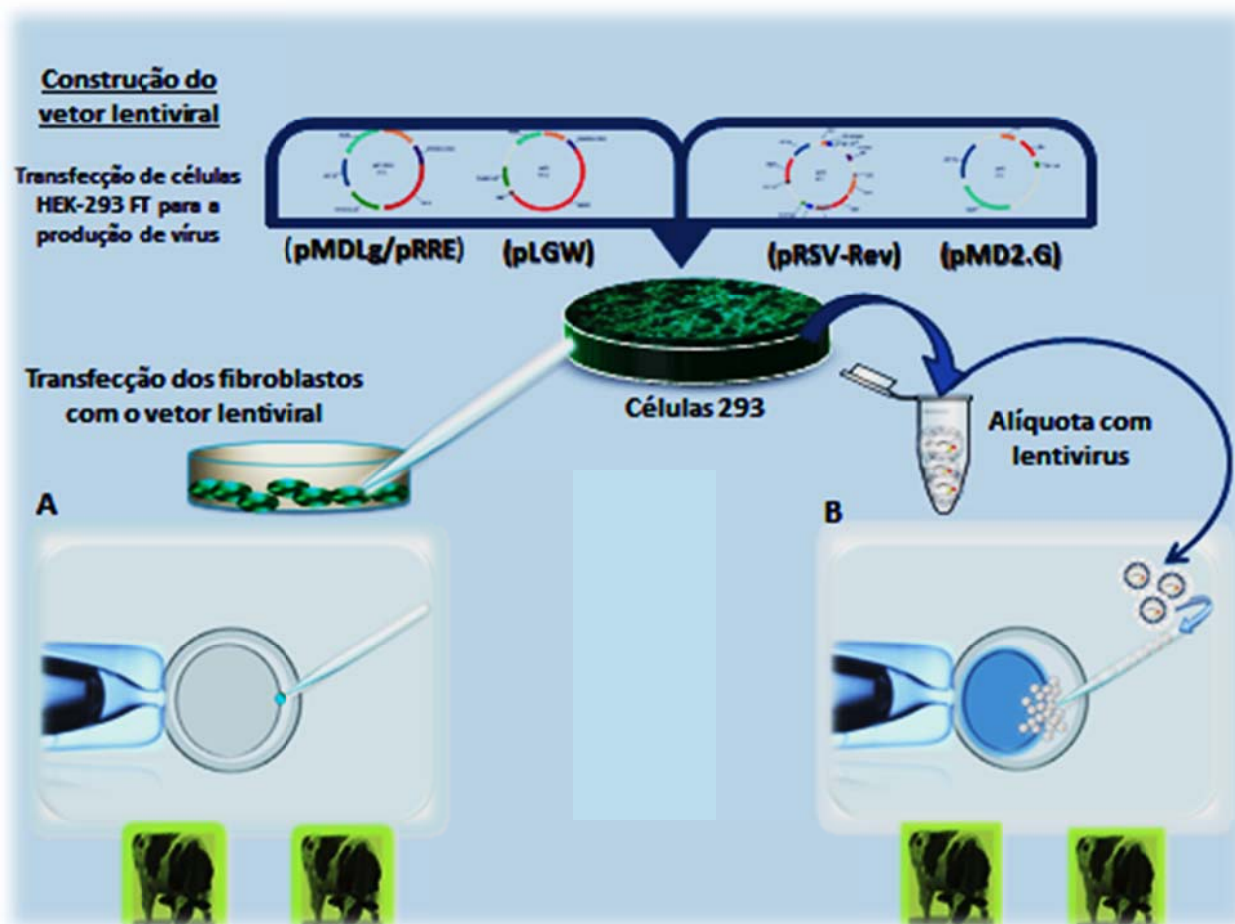
O ciclo de vida do retrovírus é dividido em duas fases distintas: a fase inicial, e a fase tardia: (1) Fixação do vírion a receptores da membrana da célula. (2) Adsorção do vírus e desnudamento da partícula. (3) Liberação do RNA viral. (4) Transcrição reversa para conversão do genoma de RNA para DNA e formação do complexo de pré-integração (PIC) (5) Penetração do DNA viral no núcleo celular. (6) Integração do DNA viral no DNA da célula hospedeira, resultando no provírus. (7) Síntese do RNA mensageiro viral, junto com o genômico, pela RNA polimerase da célula. (8) Processamento do RNAm. (9) Síntese das proteínas virais. (10) Montagem do vírus (11) brotamento. Fonte: adaptado de Nisole et al. (2004).

A integração é necessária para a replicação eficiente dos retrovírus, sendo responsável pela capacidade dos vírus entrar permanentemente na linha germinal da célula infectada (GOFF, 2004). Após a integração completa do genoma viral, o provírus é mantido na célula como qualquer gene celular (LEWIS et al., 1994). Deste modo, o provírus utiliza a maquinaria celular para a transcrição primária do RNA genômico. Parte do RNA viral sintetizado é processada para gerar o mRNA, que será traduzido nas proteínas virais apropriadas, no citoplasma (TURNER et al., 1999). No citoplasma, o mRNA usa a maquinaria da síntese de proteínas celulares para produzir as longas cadeias de proteínas e enzimas virais. Como último passo, o core viral é montado e o vírus é liberado por brotamento da membrana citoplasmática, sendo acoplado às proteínas do envelope, originando, assim, partículas virais maduras infecciosas (COFFIN et al., 1996; LEROUX et al., 2008).

#### **2.1.3.4 Construção de vetores lentivirais**

O genoma lentivírus derivado do HIV-1 é dividido em vários fragmentos para minimizar a formação potencial de replicação competente do vírus. A produção de vetores lentivirais baseia-se em um processo denominado de transfecção transiente de três ou quatros plasmídeos (PARK, 2007), realizada sobre uma monocamada de células aderentes chamada de células empacotadoras. Nessas células, os plasmídeos de empacotamento e de envelope têm seus genes transcritos e traduzidos, para produzir as proteínas estruturais e as enzimas necessárias à formação dos vírus. A grande maioria dos lentivirais é feita por transfecção transitória na linhagem comercial das células embrionárias de rim humano HEK 293 (Figura 5) (PFEIFER, 2004).

Os vetores retrovirais são obtidos substituindo-se as sequências trans, ou seja, os três genes virais (gag, pol e env) por um ou mais genes. O conjunto de sequências cis, ou seja, as seqüências reguladoras necessárias para a encapsulação (seqüência  $\psi$ ), a transcrição reversa (PBS, R, PPT) e a expressão dos genes (LTR) são conservadas neste processo (PRIVATO, 2005).



**Figura 5. Produção do vetor Lentiviral.**

Os vetores lentivirais são produzidos após transfecção das células HEK- 293FT com quatro plasmídeos, o plasmídeo pLGW, que contém o transgene e os três vetores plasmidiais, o vetor envelope (Env) pMD2.G, o vetor empacotador (pMDLg/pRRE) e o vetor da proteína rev. pRSV-Rev. Os vetores virais, que são recolhidos no sobrenadante, são utilizados para. A- modificação genética dos fibroblastos usados para transferência nuclear de células somáticas. B- injeção de vetores lentivirais no espaço perivitelino de zigoto. Fonte: arquivo pessoal.

### ❖ Vetores lentivirais de primeira geração

Os vetores lentivirais de primeira geração são constituídos por dois plasmídeos, sendo que o primeiro é representado pelo genoma do HIV-1 selvagem, com a exclusão de 1 a 2 Kb de seqüência de envelope viral, podendo também possuir um gene terapêutico. O segundo plasmídeo contém um gene que sintetiza o envelope viral, gene esse deletado no primeiro plasmídeo. Essa estratégia obteve muito sucesso e permitiu a investigação de aspectos básicos da biologia do vírus, como, por exemplo, o tropismo do mesmo (TENÓRIO et al., 2008). Tem sido demonstrado que o tropismo dos

lentivírus pode ser aumentado pela substituição da proteína do envelope viral *env* pela proteína do envelope de outros vírus (PFEIFER e VERMA, 2001). Este procedimento é denominado pseudotipagem (TENÓRIO et al., 2008). Entre as proteínas usadas, podem-se citar a glicoproteína do envelope de MLV (PAGE et al., 1990) e a proteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) (YEE et al., 1994). A substituição do envelope do HIV-1 pela proteína G (VSV-G) foi um grande avanço no desenvolvimento dos vetores lentivirais, já que reconhece fosfolipídios da membrana plasmática e não receptores específicos (HOUDEBINE, 2005). O envelope VSV-G confere características particulares inovadoras, como a capacidade de transduzir uma ampla gama de células hospedeiras e conferir resistência mecânica para as partículas virais. Assim, elas ficam mais estáveis e podem ser concentradas através de ultracentrifugação. Deste modo, obtém-se elevados títulos virais, sem perda de infectividade. Além destas características, o vetor lentiviral tem capacidade de dirigir-se para uma via endocítica, tornando-se então, cada vez mais seguro (BURNS et al., 1993; NALDINI et al., 1996; TRONO, 2000; COCKRELL e KAFRI, 2007).

#### ❖ Vetores lentivirais de segunda geração

O processo de segurança dos vetores lentivirais é obtido com a eliminação da maioria dos genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) não essenciais à replicação, mas importantes na patogenicidade. Estas sequências, no início mantidas nos plasmídeos de empacotamento de primeira geração, são em uma segunda etapa inativadas ou deletadas, gerando sistemas de empacotamento de segunda geração (NALDINI et al., 1996; DULL et al., 1998 ; PRIVATO, 2005). Vetores de segunda geração são constituídos por três plasmídeos: o empacotador, o envelope e o vetor de transferência. (TENÓRIO et al., 2008).

O plasmídeo empacotador possui informações para produção das proteínas *Gag* e *Pol*, sendo o gene *Gag* responsável pela codificação das proteínas do capsídeo viral e o gene *Pol* responsável pela codificação da transcriptase reversa. O plasmídeo envelope *Env* (responsável pela codificação das proteínas do envelope) e o terceiro plasmídeo possuem o cassete de expressão de interesse do pesquisador, próximo ao sinal de empacotamento

( $\phi$ ), para permitir a inclusão desse RNAm na partícula viral, que será integrado ao genoma da célula-alvo, para a produção da proteína de interesse (DALBA et al., 2007; TENÓRIO et al., 2008).

Estes vetores têm sido úteis para estudar o ciclo de replicação do HIV, mas permanecem sendo ainda inferiores, devido aos baixos títulos virais e alto risco de formação de vírus de replicação competente (PAROLIN et al., 1994).

#### ❖ Vetores lentivirais de terceira geração

Os vetores lentivirais de terceira geração podem ser gerados pela exclusão das sequências do promotor e sequências do potenciador dentro dos LTRs pela deleção de 400 pb na região U3 do LTR 3', o que enfraquece a atividade promotora da LTR 5' após a integração (PARK, 2007). Estes vetores são chamados auto-inativados (SIN – Self Inactivating) (KIM et al., 1998, MIYOSHI et al., 1998; ZUFFEREY et al., 1998; IWAKUMA et al., 1999). Os vetores de lentivirais SIN impedem o silenciamento do transgen, já que estudos anteriores relataram que a sequência ativa do promotor viral na LTR 5' pode atrair máquinas de silenciamento da célula hospedeira para o provírus integrado (PFEIFER, 2004). Os vetores SIN permitem níveis de expressão elevados dos transgenes por intermédio de promotores internos, os quais podem ser de natureza constitutiva ou tecido-específico (PFEIFER, 2004; PRIVATO, 2005).

Os vetores de terceira geração possuem quatro plasmídeos: vetor terapêutico, empacotador (com RRE – rev responsive element, elemento de resposta a Rev), envelope e Rev. Uma estratégia utilizada neste sistema foi a separação da sequência rev do vetor empacotador (TENÓRIO et al., 2008). Tal fato se faz necessário, pois a sequência apresenta duas funções principais. Uma seria aumentar o título da produção viral e a eficiência da transdução devido ao transporte de RNAm para o citoplasma, pela ligação da proteína à região RRE do RNAm viral (POLLARD e MALIM, 1998; TENÓRIO et al., 2008). A outra função seria estabilizar a transcrição lentiviral (SCHNEIDER et al., 1997; KOTSOPOULOU et al., 2000, WAGNER et al., 2000). Portanto, é

extremamente importante sua presença no sistema de vetor lentiviral de última geração.

#### **2.1.4 Transferência Nuclear de Células Somáticas**

A técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ou clonagem animal pode ser utilizada como uma alternativa para a produção de animais transgênicos expressando uma proteína de interesse (ZHANG et al., 2010). Uma das maiores diferenças entre a transferência nuclear de células somáticas e as outras técnicas é a capacidade de selecionar e verificar a expressão do DNA exógeno, quando incorporado no genoma celular antes da utilização destas na transferência nuclear (ROH et al., 2000; LEE et al., 2005; LUZARDO, 2010; ZHANG et al., 2010). A TNCS usa células transfectadas *in vitro* com vetores para expressão de DNA, sendo este incorporado ao genoma do animal (HOUDEBINE, 2005).

A TNCS consiste em transferir, por meio de micromanipulação, o núcleo de uma célula somática diferenciada, portadora de um genoma diplóide completo, para o interior de ovócitos enucleados, resultando na produção de indivíduos geneticamente idênticos ao animal doador de núcleo (PEREIRA e FREITAS, 2009). A produção de animais pela TNCS oferece uma gama de oportunidades no ensino básico e investigação aplicada, na agricultura, na conservação genética e na medicina humana (CAMPBELL et al., 2007). No entanto, a produção de ruminantes pela técnica de transferência nuclear envolve múltiplas etapas que podem influenciar diretamente no resultado final (PEREIRA e FREITAS, 2009). Resumidamente, as principais etapas do processo compreendem a maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos, que envolve a ruptura de membrana nuclear ou vesícula germinativa (RVG), e a seqüência de etapas que completam a meiose I (MI) até ocorrer à exclusão do primeiro corpúsculo polar, atingindo a metáfase da segunda divisão meiótica (MII) (Otero, 2008).

Durante o procedimento de TNCS, o material nuclear ovocitário deve ser totalmente removido ou enucleado, resultando apenas o citoplasma. Deste

modo, são aspirados os cromossomas constituintes do DNA haplóide da célula germinativa feminina (ONISHI et al., 2000). Após enucleação, no espaço perivitelínico do citoplasma receptor é injetada uma célula transgênica ou modificada geneticamente (BRESSAN et al., 2008). O procedimento de transfecção e a seleção das células que expressam o transgene é fundamentalmente importante para o sucesso da produção de animais transgênicos (LUZARDO, 2010). Posteriormente, o ovócito enucleado e a célula transgênica doadora do núcleo são fusionados por eletrofusão e, após a fusão, o ovócito é ativado para que inicie o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, seguido da transferência para fêmeas receptoras (WHEELER et al., 2003, BRESSAN et al., 2008)

Na tentativa melhorar a técnica da clonagem nos bovinos, alguns estudos têm buscado aperfeiçoar a etapa de reconstrução (Enright et al., 2003), por exemplo, descobrir os tipos de células doadoras mais permissivos a reprogramação e os protocolos para a ativação de ovócitos reconstruídos mais eficientes (IANNACCONE et al., 2001; CHOI et al., 2002).

A célula doadora tem um papel fundamental na clonagem, podendo determinar o sucesso ou não do procedimento (POWELL et al., 2004). Dentre as células somáticas que já foram usadas no processo de transferência, podem-se citar as células da glândula mamária, fibroblastos fetal e adulto, células da granulosa mural, células da tuba uterina, fibroblastos da pele, células do *cúmulus*, células tronco embrionárias e células de Sertoli (ARAT et al., 2002, POWELL et al., 2004; CAMPBELL et al., 2007; NEVES et al., 2010). Alguns tipos celulares parecem ser mais facilmente reprogramados do que outros (CAMPBELL et al., 2007). Por outro lado, as células somáticas adultas usualmente são mais difíceis de serem reprogramadas do que células fetais (HEYMAN et al., 2002). Este fato é decorrente do fato de células doadoras de núcleo cultivadas por longos períodos poderem apresentar instabilidade cromossômica e encurtamento dos telômeros, o que favorecem a perda da função de genes importantes para o desenvolvimento (GAO et al., 2003; POWELL et al., 2004; MERIGHE et al., 2010). Em pesquisas com células transfectadas, em que é necessário cultivo prolongado para a integração

estável do gene nas células doadoras, vários pesquisadores observaram menor taxa de desenvolvimento embrionário após o procedimento de clonagem enquanto outros não relataram essas limitações (ROH et al., 2000; ARAT et al., 2001; WESTHUSIN et al., 2001; MERIGHE et al., 2010).

Uma das principais causas limitantes do sucesso na clonagem de animais está ligada à fase de reprogramação celular. Esta fase é quando deve iniciar a divisão celular e tem como limitação as anomalias cromossômicas que podem eventualmente ocorrer (GONSALVES et al., 2001). Vários estudos têm demonstrado que a reprogramação incompleta e a expressão gênica anormal são, sem dúvida, uma das principais causas dos altos índices de perda gestacional e anomalias observadas nos animais clonados (YOUNG et al., 2001; DEAN et al., 2003; BRESSAN et al., 2011). Estas anomalias levam a problemas como cardiopatias, placentação anormal, hidroalantóide, deficiência imunológica, disfunção renal, alterações no metabolismo energético e hipertensão pulmonar (FAIRBURN et al., 2002; CAMPBELL et al., 2007; PEREIRA e FREITAS, 2009). A evolução destas anomalias geralmente implica em anormalidades e morte de animais clonados, provavelmente devido às alterações epigenéticas que afetam a estrutura, composição e remodelação da cromatina. A qual define e mantém a acessibilidade para a transcrição da informação genética contida no DNA (YOUNG et al., 2001; FAIRBURN et al., 2002).

A regulação do desenvolvimento embrionário é dependente das modificações epigenéticas que ocorrem na célula doadora de núcleo após a TNCS, já que o núcleo doador deverá ser submetido aos processos de remodelação e reprogramação, para se comportar como um genoma zigótico (KANG et al., 2001; ENRIGHT et al., 2003b; SAWAI et al., 2010). Na reprogramação estão envolvidas modificações no material nuclear, como estrutura da cromatina e metilação de novo do DNA (REIK et al., 2001). Estes eventos são necessários para que ocorra uma nova programação de expressão do genoma, silenciando genes da antiga célula diferenciada e estimulando genes característicos de células embrionárias.

Alguns estudos epigenéticos apresentam uma abordagem farmacológica e mostram que alguns compostos podem alterar o padrão de metilação que ajudariam na reprogramação do núcleo transferido com o propósito de melhorar o desenvolvimento dos embriões clonados (KISHIGAMI et al., 2006). Estudos recentes apontam um agente químico chamado tricostatina A (TSA). A TSA é uma droga modificadora epigenética, com intuito de promover hiperacetilação das histonas por meio da inibição da enzima histona deacetilase, em embriões recém-construídos (IWAMOTO et al., 2007; IAGER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011). A acetilação de histonas do DNA está associada ao relaxamento da estrutura da cromatina, tornando-a mais permissiva à transcrição e replicação, enquanto a deacetilação de histonas tem efeito oposto. No entanto, a cromatina de ovócitos maturados e recém-fecundados possuem baixo nível de acetilação, a cromatina de embriões em estágios de pré-implantação apresenta níveis de acetilação mais elevados (SARMENTO et al., 2004). Este fato parece estar associado a um novo padrão de expressão a ser formado no embrião, diferente daquele observado nos gametas. Em embriões murinos gerados por TNCS e tratados com tricostatina A, observou-se aumento dos níveis de acetilação na cromatina, proporcionando melhor taxa de desenvolvimento, bem como embriões de melhor qualidade (RYBOUCHKIN et al., 2006). Esses autores sugerem que a hiperacetilação induzida pelo inibidor de deacetilase pode estimular um remodelamento da cromatina mais efetivo, bem como a demetilação do DNA, observada comumente em embriões fertilizados. Outros estudos verificaram que embriões clones bovinos e suínos tratados com TSA melhoraram o desenvolvimento e reduziram o nível de metilação do DNA a valores semelhantes aos observados em embriões fertilizados *in vitro* (IWAMOTO et al., 2007; IWAMOTO et al., 2008; CERVERA et al., 2009).

## **2.2 Proteína Fluorescente Verde (GFP) como Gene Repórter.**

As proteínas fluorescentes tornaram-se uma ferramenta de investigação de células vivas. A proteína fluorescente mais proeminente tem sido derivada de um tipo de água-viva, *Aequorea victoria*, a *green fluorescent protein*

(avGFP) (PATTERSON, 2004). A proteína fluorescente verde (GFP), emite fluorescência na zona verde do espectro visível. É comumente utilizada como um marcador porque é de fácil visualização sob a luz UV (LIU et al., 2008). A GFP é facilmente detectada, pois a sua expressão pode ser vista nas células vivas (CHALFIE et al., 1994, PRASHER, 1995). Deste modo, tem sido amplamente usada como um gene repórter nos estudos de animais transgênicos, constituindo-se importante marcador para verificação do sucesso na inserção de genes (LIU et al., 2008).

Embora vários estudos indiquem que a expressão da GFP pode reduzir a viabilidade das células transfectadas (HANAONO et al., 1997), não têm sido relatados efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário devido à expressão da GFP (ROH et al., 2000; ARAT et al., 2001). Alguns resultados interessantes já foram obtidos em bovinos, caprinos e suínos, indicando que a visualização da GFP pode ser utilizada para selecionar as células geneticamente modificadas antes da TNCS. Portanto, pode-se aumentar a taxa de natalidade e reduzir o custo de produção de animais transgênicos (LEE et al., 2005).

A GFP também pode ser útil para verificar a eficiência de transfecção com vetores lentivirais, no silenciamento gênico, para quantificação do título viral, (DANN et al., 2006) ou a perda de expressão do transgene sobre tempo ou gerações. Num estudo feito por Kvell et al. (2010), foram gerados camundongos transgênicos por meio de vetores lentivirais, para demonstrar que a expressão do gene GFP tinha distribuição uniforme sem mosaicismo. Este pesquisadores conseguiram manter a expressão do GFP ao longo de seis gerações e só um recém-nascido apresentou inativação do gene GFP. Outra aplicação importante é na investigação de interações materno-zigóticas, em que o endométrio responde de forma diferente para embriões clonados em comparação com embriões produzidos por fertilização *in vitro*. Os embriões clones transgênicos podem ser identificados no endométrio no momento da pré-implantação no útero por meio da expressão do GFP, levando com isto a identificar a baixa viabilidade dos embriões clonados que expressa redução na taxa de implantação e a deficiência placentária (REICHENBACH 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no período de julho de 2011 até abril de 2012, nos Laboratórios de Reprodução Animal (LRA), Microbiologia do Leite (LML) e Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, Brasil, e conduzidos de acordo com o delineamento experimental abaixo.

#### ETAPA I

##### PRODUÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL

Cultivo de linhagem celular HEK-293



Montagem do vetor lentiviral em  
células HEK 293

#### ETAPA II

##### Experimento I

Colheita e maturação *in vitro* de ovócitos



**Microinjeção dos ovócitos  
pré-fecundação com vetor lentiviral**



Fecundação *in vitro*



Cultivo *in vitro* (CIV)



Avaliação da taxa de blastocistos  
e da expressão do GFP

##### Experimento II

Colheita e maturação *in vitro* de ovócitos



Fecundação *in vitro*



**Microinjeção dos zigotos seis horas  
pós-fecundação com vetor lentiviral**



Cultivo *in vitro* (CIV)



Avaliação da taxa de blastocistos  
e da expressão do GFP

### **EXPERIMENTO 3**

Estabelecimento de linhagens de células somáticas modificadas geneticamente

“LENTIVIRUS”



Colheita e maturação *in vitro* de ovócitos



**Transferência nuclear com células somáticas modificadas**



Ativação partenogenética



**Tratamento dos zigotos com tricostatina A**



Avaliação da taxa de blastocistos  
e da expressão do GFP

## **3.1 ETAPA I**

### **3.1.1 PRODUÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL**

#### **3.1.1.1 Preparo e cultivo das células a serem utilizadas na produção dos vetores lentivirais**

##### **A. Linhagem celular**

Foram utilizadas células da linhagem HEK-293 (ATCC CRL 1573). São células embrionárias de rim humano, que possuem como características a facilidade do cultivo por longos períodos, a transfecção simples e eficiente com os mais diversos tipos de vetores, bem como a expressão transgênica de diversas proteínas (GRAHAM et al., 1977, SHAW et al., 2002). As células foram cultivadas em meio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM –

Gibco/Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de penicilina/estreptomicina, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### B. Subcultivo

As células foram cultivadas em frascos de cultivo T75, e após aproximadamente três dias, as células atingiram confluência de 70%. Neste período, realizou-se a primeira passagem ou o primeiro repique celular, por meio de tripsinização. Quando se obteve uma monocamada de células com 90% de confluência estas foram criopreservadas para a criação de um banco de células a ser posteriormente utilizado na geração dos vetores lentivírais.

#### C. Criopreservação

As células das garrafas foram ressuspensas em 1 mL de solução de tripsina 0,25% EDTA (SIGMA), seguindo o mesmo processo realizado para a tripsinização no subcultivo. Após a ressuspensão, a ação da tripsina foi bloqueada pela adição de meio de cultivo completo DMEM, com 10% de soro fetal bovino (SFB), seguindo uma centrifugação de três minutos a 18.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspensado com DMEM 20% SFB + 10% DMSO em gelo. As células foram distribuídas em criotubos e congeladas a -70 °C com posterior transferência (dois a três dias após) para nitrogênio líquido.

### **3.1.1.2 Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial**

#### A. Transformação em *Escherichia coli*

As bactérias *E. coli* utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Leite – LML/EMBRAPA – e sua transformação com os quatro plasmídeos [(pMDLg/pRRE), (pMD2.G), (pRSV-Rev) (Addgene, EUA) e

(pLGW) (CIGB, Cuba)] foi realizada segundo o método de transformação por choque térmico estabelecido previamente. A representação esquemática de cada um dos plasmídeos encontram-se nos anexos.

Após o descongelamento das bactérias *E. coli* em gelo, foi adicionado 1 µL do plasmídeo em 100 µL de suspensão de bactérias. Em seguida, as bactérias foram incubadas em gelo por 15 minutos, submetidas a choque térmico a 42 °C, por 2 minutos, e imediatamente colocadas no gelo, enquanto o meio de cultura era aquecido. Adicionou-se, lentamente, aos tubos de bactérias 1 mL de meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) sem antibiótico. Após delicada homogeneização, uma pequena porção do conteúdo foi semeada em placas de Petri contendo 30 mL de meio-ágar BHI, suplementado ou não com ampicilina (50 µg/mL). Foram preparadas, para cada plasmídeo, placas de controle positivo (meio sem antibiótico e bactérias não transformadas), de controle negativo (meio com antibiótico e bactérias não transformadas) e de tratamento (meio com antibiótico e bactérias transformadas). As placas foram incubadas a 37 °C, durante a noite (*overnight*). No dia seguinte, as colônias das placas dos tratamentos que possuíam maior tamanho e se apresentavam mais isoladas foram selecionadas e cultivadas em 2 a 5 mL de meio BHI líquido e ampicilina por 8 horas.

Após a transformação das bactérias com os diferentes plasmídeos, efetuou-se o congelamento de alíquotas a -80 °C em 25% (v/v) de glicerol para posterior uso, sendo a outra parte submetida aos procedimentos de amplificação.

## B. Amplificação do DNA plasmidial

De forma a propagar os plasmídeos, as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*), previamente transformadas com os mesmos, foram inoculadas em 250 mL de meio BHI líquido suplementado com ampicilina (50 µg/mL) e incubadas durante a noite (*overnight*) a 37 °C, sob agitação.

### C. Extração e purificação de DNA plasmidial de *E. coli*

A purificação dos plasmídeos foi feita mediante o método químico para a purificação do material genético por lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001). A extração e purificação do DNA foram feitas em grande escala (Maxipreparados) utilizando o *Kit Qiagen Plasmid Maxi Purification Kits* (QIAGEN, EE.UU.), segundo as instruções do fabricante. O sedimento de DNA obtido foi ressuspendido em água ultrapura estéril, quantificado no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e armazenado a -20 °C até a sua utilização.

### D. Digestão do DNA plasmidial

Cada amostra de DNA foi submetida à digestão com enzima de restrição BamHI e NCOI.

### E. Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE por 2 horas e 30 minutos. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio (Ludwig Biotec) e fotografados em foto documentador Eagle Eye II (Stratagene).

### 3.1.1.3 Montagem do vetor lentiviral

#### Transfecção de células HEK-293 para produção de vírus

Para produção dos vetores lentivirais foi utilizado protocolo sugerido pelo próprio fornecedor do plasmídeo (pLGW) (CIGB, Cuba) (Prof. Dr. Jorge R. Toledo Alonso, do Department of Physiopathology, Faculty of Biological Sciences, University of Concepción, Chile).

Os vetores lentivirais foram produzidos por transfecção transitória, utilizando quatro plasmídeos: o plasmídeo de empacotamento (pMDLg/pRRE),

o que codifica a proteína do envelope (pMD2.G), o codificador da proteína Rev (pRSV-Rev) (Addgene, EUA) e o plasmídeo contendo o transgene (pLGW) (CIGB, Cuba).

As células HEK 293 foram cultivadas em frascos T75 (meio DMEM acrescido de 10% de SFB) até atingirem o estado de 80% de confluência. Neste estágio, realizou-se a transfecção propriamente dita para a produção dos vetores lentivirais.

Cerca de 30 minutos antes do início do procedimento de transfecção o meio de cultivo foi substituído por DMEM sem SFB. Após este período, procedeu-se ao preparo do mix de transfecção contendo os quatro plasmídeos, cujas quantidades foram de 6µg de DNA de cada um dos plasmídeos estruturais (pMDLg/pRRE, pMD2.G e pRSV-Rev) e 12µg do plasmídeo de interesse (pLGW), totalizando 30µg por garrafa de transfecção.

Foram preparados dois mixes separadamente: uma mescla de polietilenoimina 18 mM (PEI, Sigma) + glicose a 5% e outra mescla de DNA plasmidial + glicose a 5%, totalizando, cada mix, um volume de 100 µL. Foi utilizada a relação de 1 µL de solução de PEI (com pH ajustado para 7) para cada 1 µg de DNA. As duas misturas foram submetidas a agitação em vórtex por 1 min e deixadas em repouso por cinco minutos. Em seguida, a mescla de PEI foi agregada ao tubo contendo a mescla de DNA e, após agitação vigorosa em vórtex, todo o conteúdo foi mantido em repouso por 10 minutos, tempo durante o qual foi efetuada nova troca de meio sem SFB na garrafa (8mL).

Foi adicionado 1 mL de DMEM sem SFB ao mix e, após homogeneização, todo o conteúdo foi acrescentado à garrafa de cultivo. Após seis horas de transfecção adicionou-se SFB ao meio de forma a obter-se a concentração de 10%.

Após 48 horas o meio de cultivo foi centrifugado a 25000 rpm por uma hora e 30 minutos a 4°C. O *pellet* de lentivírus foi ressuscitado em 100µL de meio TALP-Hepes e congelado a -80 °C até a sua utilização. Por outro lado nas condições do seguinte experimento a titulação das partículas lentivirais não foi calculada, e a transfecção só foi considerada positiva pela observação direta da fluorescência produzida pela GFP.

## 3.2 ETAPA II

### 3.2.1 Produção de embriões transgênicos bovinos com vetores lentivirais

#### 3.2.1.1 Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos

Foram utilizados 738 ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça definida e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em matadouro localizado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Imediatamente após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em garrafa térmica com solução fisiológica (0,9% NaCl) acrescentada de sulfato de estreptomicina (0,05 g/L), em temperatura variando de 35 a 38 °C. Ao término da coleta, os ovários foram transportados em garrafa térmica até o LRA em tempo máximo de trinta minutos.

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica, idêntica à primeira e previamente aquecida, e colocados em banho-maria a 37 °C. Os folículos ovarianos ( $\leq 10$  mm) foram puncionados por meio de agulha 25 x 12 mm acopladas a seringas de 10 mL. O líquido folicular foi depositado em cálice cônico mantido aquecido a 37 °C. Ao término da aspiração, aguardou-se entre cinco e 10 minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o *pellet* contendo os ovócitos foi ressuspensionado em meio Talp-Hepes após a retirada do fluido sobrenadante e transferido para placa de Petri, mantida em placa aquecedora a 37 °C. Com auxílio de um microscópio estereoscópico e uma micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri contendo meio Talp-Hepes e então classificados morfológicamente, de acordo com Costa et al. (1997). Apenas os ovócitos imaturos classificados como *cumulus* compacto e com pelo menos três camadas de células foram transferidos para uma terceira placa de Petri contendo meio Talp Hepes, e posteriormente, utilizados nos procedimentos experimentais.

### 3.2.1.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Foram utilizados 1758 ovócitos imaturos, divididos nos procedimentos experimentais, classificados com *cumulus* compacto ou com mais de três camadas de células (COSTA et al., 1997), maturados em meio TCM 199 (*Tissue Culture Medium* 199) (Gibco/Invitrogen) suplementado com FSH (Hormônio Folículo Estimulante) (20 mcg/mL) e soro de vaca em cio (10%). A maturação foi realizada em grupos de 50 – 60 estruturas e depositados em placas Nunc (Thermo Scientific; Cat.176740) de quatro poços, contendo 400 µL de meio de maturação previamente equilibrado por no mínimo duas horas em estufa incubadora a 38,5°C com atmosfera de 95% de umidade, e 5% de CO<sub>2</sub>. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 22 a 24 horas. Após terem sido maturados, foram divididos aleatoriamente para comporem o Experimento I, o Experimento II, e o Experimento III.

### 3.2.2 Experimento I – Microinjeção dos ovócitos com vetor lentiviral

Para este experimento foi utilizado um total de 834 ovócitos, distribuídos em quatro tratamentos.

**T1 = Controle.** Fecundados *in vitro* com complexos *cumulus*-ovócito (CCOs) na concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides(SPTZ)/mL, cultivados em meio CR2 acrescido de 10% de SFB em estufa incubadora a 38,5°C com atmosfera de 95% de umidade, e 5% de CO<sub>2</sub>;

**T2 = Controle de Microinjetados.** Células do *cumulus* removidas por vórtex na presença de hialuronidase, fecundados *in vitro* com  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL e cultivados em sacos plásticos (Saches de Alumínio) contendo uma mistura gasosa de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada, mantidas a temperatura de 38,5 °C. Este grupo de ovócitos foi cultivado para avaliar as condições de cultura.

**T3 = Controle de microinjetados com meio TALP.** Células do *cumulus* removidas por vórtex na presença de hialuronidase, microinjetados com meio TALP e em seguida fecundados *in vitro* com  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL, cultivados em sacos plásticos nas mesmas condições de T2.

**T4 = Microinjetados com lentivírus.** Células do *cumulus* removidas por vórtex na presença de hialuronidase, microinjetados com vetor lentiviral e depois fecundados *in vitro* com  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL, cultivados em sacos plásticos nas mesmas condições de T2 e T3.

#### 5.2.2.1 Microinjeção dos ovócitos pré-fecundação com vetor lentiviral

Após a maturação *in vitro*, as células do cumulus foram removidas dos ovócitos por adição de 0,1% de hialuronidase em agitação mecânica em aparelho tipo vórtex por cinco minutos. Em seguida, os tubos contendo os ovócitos desnudos foram lavados com meio TALP-Hepes e vertidos em placa de Petri descartável de 60 x 15 mm para recuperação dos mesmos. A avaliação da maturação nuclear dos ovócitos foi feita pela observação do corpúsculo polar utilizando estereomicroscópio (Nikon SMZ 645), sendo os considerados aptos distribuídos aleatoriamente em T2, T3 e T4. Os ovócitos foram novamente lavados em meio TALP e mantidos em gotas de 20  $\mu$ l do meio coberto com óleo mineral até o momento da microinjeção.

A injeção do meio TALP e o *Vetor Lentiviral* no espaço perivitelíneo (subzonal) foi realizada pela observação direta em microscópio invertido (Axiovert 135M, Carl Zeiss) equipado com um sistema de micromanipulação hidráulica (Nikon Narishige NT-88V3), ligado a um sistema de microinjeção. Os ovócitos foram imobilizados com a pipeta de fixação e, com a microagulha carregada procedeu-se à microinjeção subzonal com o meio TALP (T3) ou com solução contendo o vetor lentiviral (T4). Durante a manipulação, a zona pelúcida expandiu imediatamente, e a microinjeção foi considerada bem sucedida quando a zona pelúcida cresceu visivelmente (Figura 6). Após a injeção do TALP ou do lentivírus subzonal, os ovócitos foram lavados três vezes em meio TALP e novamente transferidos para o meio TCM. Durante este

período, ovócitos controle T1 e T2 (não microinjetados) permaneceram no meio TCM. Cada tratamento foi repetido pelo menos cinco vezes.



**Figura 6. Injeção subzonal do vetor lentiviral no ovócitos.**

Fonte: arquivo pessoal

### 3.2.2.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os ovócitos controle (T1 – T2) e microinjetados (T3 – T4) foram transferidos para gotas de fecundação com 100  $\mu$ L de meio FERT-TALP acrescido de 10 UI/mL de heparina (Sigma), sob óleo mineral (aproximadamente 20 ovócitos/gota). Para a fecundação foi utilizado sêmen de touro da raça Gir, previamente avaliado quanto ao vigor, motilidade e concentração. Somente doses com motilidade igual ou superior a 50% e vigor no mínimo 3 foram utilizadas, de modo que durante todo o experimento foi utilizada a mesma partida de sêmen do mesmo touro. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e os espermatozoides processados pelo método do gradiente de Percoll (Nutricell) com as concentrações de 90% e 45% para separação dos espermatozoides móveis em centrifugação, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. O gradiente de Percoll foi preparado previamente e mantido em estufa incubadora por 15 minutos antes da sua utilização. O sêmen foi diluído, com concentração ajustada para a obtenção de dose fecundante de  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL, e transferido para as gotas de fecundação (100  $\mu$ L de meio FERT-TALP). O processo de fertilização *in vitro* foi realizado por 20 horas em estufa

incubadora, nas mesmas condições da maturação dos ovócitos. (A concentração  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL, foi usada pelo fato que as células do *cumulus* eram retirada dos ovócitos e pelo procedimento da perfuração da ZP antes da fecundação, por conseguinte se buscava não causar uma poliespermia)

### 3.2.2.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a fertilização, os presumíveis zigotos foram retirados da gota de fecundação, lavados em meio TALP-HEPES, e divididos em duas placas de cultivo, onde uma foi o controle e a outra os tratamentos.

O cultivo *in vitro* dos tratamentos T2 – T3 – T4 foi realizado em placa de quatro poços tipo Nunc contendo 500  $\mu$ L de meio SOF acrescido de 2,5% de SFB, sob óleo mineral, em grupos de 30 a 40 estruturas em cada poço. Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em sacos plásticos (saches de alumínio) contendo uma mistura gasosa de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada, mantidas a temperatura de 38,5°C.

No tratamento T1 (controle) os supostos zigotos foram submetidos ao desnudamento com auxílio de um pipetador e lavados em meio TALP. O cultivo foi efetuado em gotas de 50  $\mu$ L de meio CR2 acrescido de 10% SFB sob óleo mineral, distribuídos em placas de Petri 10 x 35mm. O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa de 95%.

### 3.2.2.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário

As taxas de produção embrionária e qualidade dos embriões foram avaliadas no oitavo dia do cultivo (D8). Utilizando estereomicroscópio (Nikon SMZ 645). A avaliação dos embriões foi realizada segundo os parâmetros descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (do inglês, International Embryo Transfer Society – IETS) (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

### 3.2.2.5 Avaliação da expressão do GFP

A avaliação da expressão do GFP foi realizada visualmente, em blastocistos, por meio de exposição dos mesmos à luz branca e ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm) ou microscópio de fluorescência (Motic, BA400, filtro de 465-495nm). Foram calculadas as taxas de blastocistos que expressam o GFP para os tratamentos T1, T2, T3 e T4.

### 3.2.3 Experimento II – Microinjeção dos zigotos seis horas pós-fecundação com vetor lentiviral

Para este experimento foi utilizado um total de 760 ovócitos, distribuídos em quatro tratamentos:

**T1 = Controle.** Fertilização *in vitro* com concentração de  $4 \times 10^6$  SPTZ/mL, por um período de 20 horas, sem desnudamento, com cultivo em meio CR2 acrescido de 10% de SFB em estufa incubadora a 38,5°C com atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

**T2 = Controle de Microinjetados.** Fertilização *in vitro* com concentração de  $4 \times 10^6$  SPTZ/mL por um período de seis horas, procedendo-se ao cultivo em meio meio SOF acrescido de 2,5% de SFB, em sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada, mantidas a temperatura de 38,5°C. Esses ovócitos foram cultivados para avaliar as condições de cultura.

**T3 = Controle de microinjetados com meio TALP.** Fertilização *in vitro* com concentração de  $4 \times 10^6$  SPTZ/mL por um período de seis horas procedendo-se à microinjeção com meio TALP e cultivo em sacos plásticos nas mesmas condições de T2.

**T4 = Microinjetados com lentivírus.** Fertilização *in vitro* com concentração de  $4 \times 10^6$  SPTZ/mL por um período de seis horas procedendo-se à microinjeção

com vetor lentiviral e cultivo em sacos plásticos nas mesmas condições de T2 e T3.

### 3.2.3.1 Fecundação *in vitro*

Após a maturação, os ovócitos foram fertilizados com sêmen de touro da raça Gir. Durante todo o experimento foi utilizada a mesma partida de sêmen do mesmo touro. A seleção dos espermatozóides foi realizada por meio do gradiente de percoll, com concentração espermática ajustada para  $4 \times 10^6$  SPTZ/mL por gota de 100 $\mu$ L de meio FERT-TALP acrescido de 10 UI/mL de heparina (Sigma). Os gametas permaneceram co-incubados sob as mesmas condições citadas para a MIV por um período de seis horas para os grupos experimentais (T2 – T3 –T4) e por 20 horas para o grupo controle (T1). (A concentração  $4 \times 10^6$  SPTZ/mL, foi usada pelo fato que os ovócitos do grupo T2, T3, T4, só ficariam seis horas no meio FERT-TALP e por conseguinte se busca obter uma maior taxa de penetração espermática)

### 3.2.3.2 Microinjeção dos Zigotos seis horas pós-fecundação com vetor lentiviral

Após 6 horas do início da fecundação *in vitro*, os supostos zigotos foram retirados da gota de fecundação e submetidos à remoção completa das células do *cumulus* utilizando-se de vórtex, e em seguida, transferidos para placa de Petri descartável de 60 x 15 mm para recuperação dos mesmos. Os supostos zigotos foram novamente lavados em meio TALP e mantidos em gotas de 20  $\mu$ l do meio coberto com óleo mineral até o momento da microinjeção. A injeção do meio TALP ou do vetor lentiviral no espaço perivitelíneo (subzonal) foi monitorada pela observação direta em microscópio invertido (Figura 7). As estruturas foram imobilizadas com a pipeta de fixação e, com a microagulha carregada procedeu-se à microinjeção subzonal com o meio TALP (T3) ou com solução contendo o vetor lentiviral (T4). Durante a manipulação, a zona pelúcida expandiu imediatamente. Após a microinjeção, os supostos zigotos foram lavados três vezes em meio TALP e transferidos para o meio de cultivo correspondente. Durante este período, os supostos

zigotos do grupo controle T1 continuaram nas gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio FERT-TALP até completarem 20 horas de fecundação. Cada tratamento foi repetido pelo menos cinco vezes.



**Figura 7. Injeção subzonal do vetor lentiviral no zigoto 6 horas pós-fecundação.** Fonte: arquivo pessoal.

### 3.2.3.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* dos tratamentos T2 – T3 – T4 foi realizado em placa de quatro poços tipo Nunc contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio SOF acrescido de 2,5% de SFB, sob óleo mineral, em grupos de 30 a 40 estruturas em cada poço. Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em sacos plásticos fechados, contendo uma mistura gasosa de 5% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$  e 90% de  $\text{N}_2$  em umidade saturada, mantidas à temperatura de 38,5°C.

Após 20 horas do início da fecundação *in vitro*, os supostos zigotos do T1 grupo controle foram submetidos à pipetagem para retirada das células do *cumulus* e lavados em meio TALP. O cultivo foi efetuado em gotas de 50  $\mu\text{L}$  de meio CR2 acrescido de 10% de SFB distribuídas em placas de Petri 10 x 35 mm e sob óleo mineral, em estufa de cultivo celular com 5% de  $\text{CO}_2$  e umidade relativa de 95% a 38,5°C.

### 3.2.3.4 Avaliação da taxa de clivagem e taxa de blastocistos

Após 72 horas do início da fecundação *in vitro*, os embriões contidos nas placas de cultivo foram classificados quanto à ocorrência ou não de clivagem. A taxa de produção de blastocistos e a classificação morfológica dos embriões foi avaliada no sétimo dia (D7) e oitavo dia (D8) do cultivo. A qualidade embrionária foi avaliada de acordo com os critérios recomendados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

### 3.2.3.5 Avaliação da expressão do GFP

A avaliação da expressão do GFP foi realizada visualmente, em blastocistos, por meio de exposição dos mesmos à luz branca e ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm) ou microscópio de fluorescência (Motic, BA400, filtro de 465-495nm). Foram calculadas as taxas de blastocistos que expressam o GFP para todos os tratamentos.

## 3.2.4 Experimento III - Efeito da tricostatina A em embriões clones modificados geneticamente com GFP

Avaliou-se o efeito de um inibidor de histona deacetilase (tricostatina A) em embriões clones modificados geneticamente expressando o gene da proteína fluorescente verde (GFP). Para este experimento foi utilizado um total de 164 ovócitos, distribuídos em três tratamentos.

**T 1 = NT-Trico:** zigotos recém reconstruídos com células modificadas geneticamente e submetidos à tricostatina;

**T 2 = NT:** zigotos recém reconstruídos com células modificadas geneticamente e não submetidos à tricostatina;

**T 3 = PART:** zigotos gerados por ativação partenogenética (controle para o processo de ativação dos ovócitos e cultivo dos embriões).

### 3.2.4.1 Estabelecimento de linhagens de células somáticas modificadas geneticamente

#### A. Célula Doadora de Núcleo

Para a reconstrução dos embriões foram utilizadas células de fêmeas adultas (fibroblastos) oriundas da orelha de uma vaca da raça Gir, cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de SFB e 0,1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina). O cultivo para estabelecimento das linhagens celulares foi realizado por aproximadamente 14 dias, em incubadora mantida a temperatura em 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade. Por meio de um microscópio de fase invertido (ICM 405, Zeiss, Alemanha), foi observado o crescimento celular e, ao atingirem 80% de confluência na placa, as células foram congeladas em solução DMEM com 20% de SFB e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO – SIGMA) na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). Assim, um banco de células foi formado para ser utilizado ao longo do experimento, estando todas na segunda passagem celular.

#### B. Transfecção dos fibroblastos com o vetor lentiviral.

Para a transferência gênica dos fibroblastos, foi utilizado o sistema de vetores lentivirais contendo o gene GFP como repórter, sem gene de resistência a antibiótico, gerados na linhagem celular HEK-293. Os fibroblastos foram descongelados e cultivados na presença do vetor lentiviral por 48 h e avaliados quanto à expressão do GFP. Células expressando o GFP foram selecionadas e repicadas por 12 passagens objetivando o estabelecimento de linhagens. Após esse processo, as células foram congeladas em DMEM com SFB e dimetil sulfoxido (DMSO) em nitrogênio líquido para posterior reconfirmação visual da expressão de GFP e uso na TNCS.

### C. Microscopia de fluorescência.

A expressão do GFP nas células doadoras de núcleo e modificada geneticamente foi realizada visualmente, por meio de exposição das mesmas à luz branca e ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm) ou microscópio (Motic, BA400, filtro de 465-495nm).

#### 3.2.4.2 Maturação *in vitro*.

Os ovócitos foram maturados em meio TCM199 com soro de vaca em ciclo em incubadoras de CO<sub>2</sub> por 18h para a TNCS e 22h para ativação partenogenética

#### 3.2.4.3 Transferência nuclear com células somáticas

Para a produção de embriões pela TNCS, os fibroblastos modificados geneticamente com GFP (para os tratamentos 1 e 2) foram descongelados e cultivados em DMEM com 10% de SFB por um dia. Os fibroblastos foram, então, recuperados após tripsinização e utilizados para reconstrução do zigoto.

#### 3.2.4.4 Enucleação, reconstrução e fusão

Após 18 horas da MIV as células do cumulus foram removidas dos ovócitos por adição de 0,1% de hialuronidase com agitação mecânica em aparelho tipo vórtex por cinco minutos. Logo depois, os ovócitos que apresentavam o 1º corpúsculo polar foram selecionados para enucleação. O material aspirado foi submetido à luz ultravioleta para confirmação da retirada do material genético, após coloração com Hoescht.

A reconstrução foi realizada pela transferência das células doadoras de núcleo (Fibroblastos) modificadas geneticamente expressando GFP e com auxílio de micropipeta, cada célula (GFP+) foi colocada no espaço perivitelino dos ovócitos enucleados. Imediatamente após a reconstrução, os complexos citoplasma receptor – núcleo doador foram colocados e posicionados em um manipulador elétrico de células e a fusão foi induzida usando dois pulsos elétrico (2,4 kV) em meio com manitol.

#### 3.2.4.5 Cultivo *in vitro* dos embriões

Conjuntos de embriões reconstruídos foram cultivados em CR2a por 2 horas e os conjuntos que se apresentaram fusionados foram ativados com ionomicina por quatro minutos seguido de quatro horas em 6-DMAP. Zigotos recém-construídos foram cultivados em meio CR2aa com 2,5% de SFB cobertas com óleo, em 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> a 38.5°C

#### 3.2.4.6 Tratamento dos embriões com tricostatina A

Durante o cultivo com 6-DMAP e nas 7h seguintes, o grupo T1 (zigotos recém-construídos por TNCS) foi cultivado em meio contendo tricostatina A (50 nM) dissolvida em meio CR2aa sem SFB ou com 2,5% de SFB coberto com óleo, em 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> a 38.5°C, totalizando 11h de cultivo na presença da tricostatina A.

#### 3.2.4.7 Ativação partenogenética (AP)

Para avaliar a eficiência do processo de ativação dos zigotos, embriões partenogenéticos foram produzidos e utilizados como controle (T3). Ao término da maturação, as células do *Cumulus* foram removidas dos ovócitos em

hialuronidase a 0,1%, seguindo-se lavagem com meio TALP-Hepes. Os ovócitos foram incubados em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico com umidade saturada a 38,5 °C, por 4 minutos em solução de ionomicina (4,62 µM) (Sigma St. Louis, USA) em meio CR2aa. A seguir, os ovócitos foram novamente lavados em meio CR2aa e incubados por mais quatro horas em solução 6-DMAP (2mM em PBS)(Sigma St. Louis, USA) a 38°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Após esse período de incubação, os ovócitos foram novamente lavados em meio CR2aa e cultivados *in vitro* em placas de quatro poços com 500 uL de meio a 2,5% de SFB, sob óleo mineral, em estufa incubadora com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>.

#### 3.2.4.8 Avaliação do desenvolvimento embrionário

A clivagem foi avaliada 72 horas após a reconstrução, onde foram considerados clivados os embriões que apresentavam duas ou mais células, sem sinais de fragmentação ou degeneração celular. As taxas de produção embrionária e qualidade dos embriões foram avaliadas em D7. A qualidade embrionária foi avaliada de acordo com os critérios recomendados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

#### 3.2.4.9 Avaliação da expressão do GFP

A avaliação da expressão do GFP foi realizada visualmente, em blastocistos, por meio da exposição dos mesmos à luz branca e ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm) ou microscópio de fluorescência (Motic, BA400, filtro de 465-495nm). Foram calculadas as taxas de blastocistos que expressam o GFP para os tratamentos T1, T2 e T3.

### **3.3 Análise estatística**

As variáveis qualitativas (taxas de clivagem, de blastocistos e de embriões que expressaram GFP) foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste do qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002). As taxas de desenvolvimento embrionário do experimento III, em que foram realizadas quatro repetições, foram avaliadas por meio de análise de variância. As médias das variáveis foram comparadas utilizando o teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

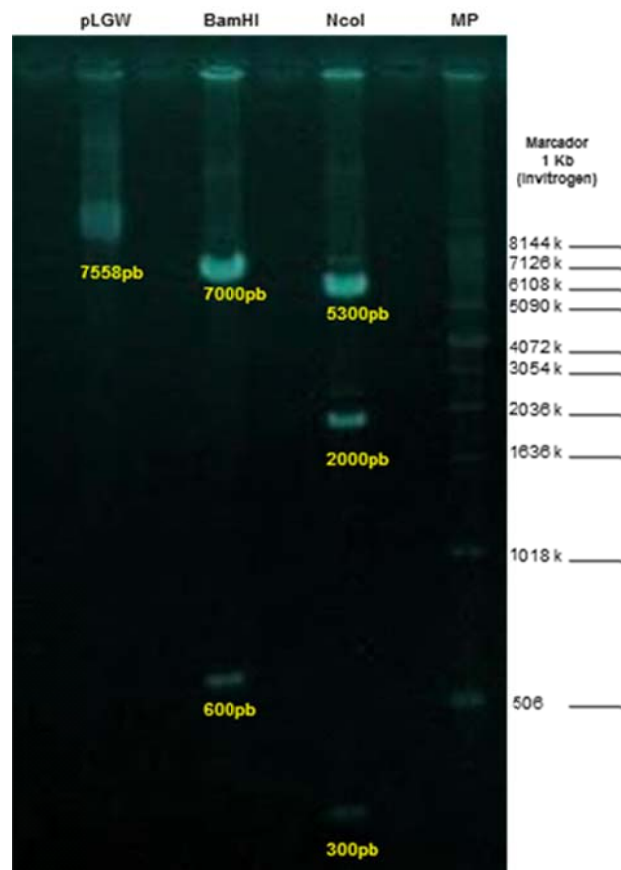
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão expostos de acordo com os itens apresentados no Material e Métodos.

### 4.1 Etapa I

#### 4.1.1 Produção do vetor lentiviral

O plasmídeo pLGW foi avaliado quanto à sua integridade, pureza e perfil de restrição (ausência de DNA cromossômico bacteriano) em corrida eletroforética com gel de agarose 0,8%.



**Figura 8. Eletroforese do plasmídeo pLGW expandido.**

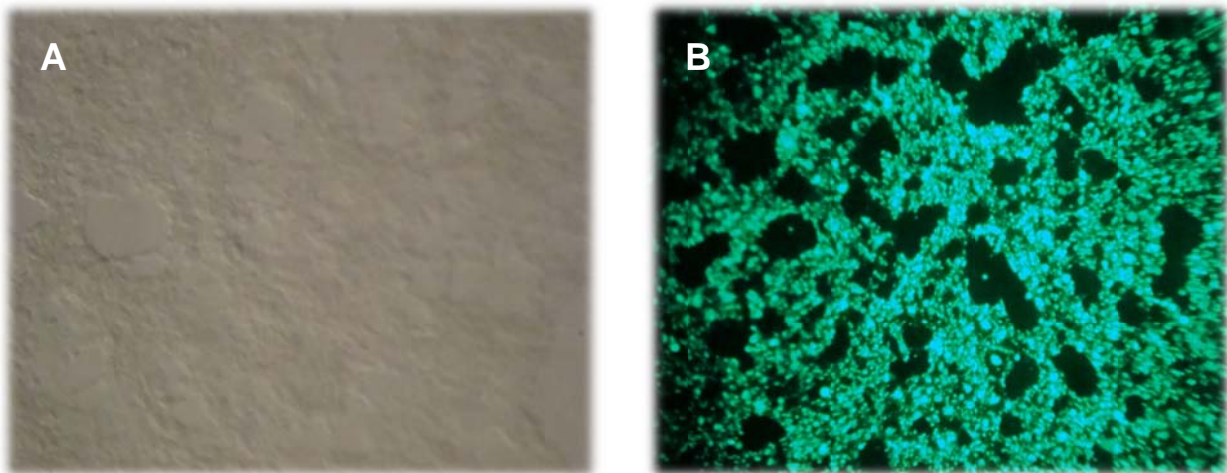
Eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE durante 2 horas e 30 minutos, corado com brometo de etídio e analisado sob luz ultra-violeta. **pLGW** - plasmídeo não digerido do fragmento de 7558 pb. (2) **BamHI** - plasmídeo digerido com a enzima de restrição BamHI e liberação do fragmento de 600 pb.(3) **NCOI** – plasmídeo digerido com a enzima de restrição NCOI e liberação do fragmento de 300 pb.(4) **MP** – marcador em escada de 1 kb (invitrogen).

#### 4.1.2 Montagem do vetor lentiviral

A fim de gerar partículas lentivirais foi realizada a co-transfecção das células embrionárias de rim humano HEK-293, utilizando quatro plasmídeos: o plasmídeo contendo o transgene pLGW, e os plasmídeos auxiliares contendo os genes virais necessários para a montagem da partícula viral, pMDLg/pRRE, pMD2.G e pRSV-Rev. O plasmídeo pLGW, que contém a sequência de DNA correspondente à GFP foi utilizada como um gene marcador para determinar a eficiência do método de transfecção. Foram realizados os procedimentos de transfecção polietilenoimina (PEI), que é um polímero catiónico amplamente utilizado como um portador para a entrega de DNA. Este polímero condensa o DNA em partículas carregadas positivamente, que se ligam a resíduos de superfície aniônicos celulares e são levados para dentro da célula por endocitose (VANCHA et al., 2004; GAO et al., 2007), mediando a transfecção das células eucarióticas. Toledo et al. (2009) avaliaram a eficiência de transfecção do PEI sobre a eficiência de outro agente de transfecção, como o fosfato de cálcio (CaPO<sub>4</sub>). Os resultados mostraram que o PEI apresentou uma taxa superior a 90% de eficiência de transfecção de genes comparado aos métodos de CaPO<sub>4</sub>. Os rendimentos de título viral foram de cerca de  $1 \times 10^7$  mililitros por partículas lentivirais infectantes.

Por outro lado, foi demonstrado que as células expressaram de maneira estável os plasmídeos que continham os genes gag, pol, rev e env. Alguns trabalhos demonstram que a utilização da proteína VSV-G desempenha um papel fundamental neste processo, uma vez que esta interage com os componentes de fosfolípidos da membrana plasmática da célula hospedeira e não com receptores específicos, aumentando assim uma ampla gama de células hospedeiras. (NALDINI et al., 1996; BUCHSCHACHER e WONG-STAAAL, 2000). Além do mais, os vetores lentivirais podem ser concentradas através de ultracentrifugação obtendo elevados títulos virais e mantendo a capacidade de infectar as células (BURNS et al., 1993).

No presente experimento, foi verificada a produção de GFP na cultura celular linha 293 ao fim de 48 horas após a transfecção, por meio de observação direta em microscópio de fluorescência (Figura 9).



**Figura 9: Análise da fluorescência da GFP, na linha celular HEK-293.**

Geração de partículas lentivirais mediada pelo método de transfecção PEI na linha celular 293 (A) Células de campo claro (Fotografias tomadas de estereomicroscópio) Aumento de 40X. (B) células expostas à radiação ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm), fluorescência verde produzida pela GFP. Aumento 40X. Fonte: arquivo pessoal.

## 4.2 ETAPA II

### Produção de embriões transgênicos bovinos

#### 4.2.1 Experimento I – Microinjeção dos ovócitos com vetor lentiviral.

Na primeira etapa experimental, foram utilizados 834 ovócitos distribuídos em quatro tratamentos, como exposto na Tabela 1. Foram realizadas cinco repetições por tratamento.

**Tabela 1-** Produção de embriões transgênicos, por meio do método de microinjeção de vetores lentivirais nos ovócitos maduros de bovinos

Ovócitos	O2	Meio	n	D8	%	GFP+ (%)
T 1.	Ar atm.	CR2	308	66	(21,4) <sup>a</sup>	0
T 2.	5%	SOF	191	31	(16,2) <sup>a</sup>	0
T 3.	5%	SOF	145	26	(17,9) <sup>a</sup>	0
T 4.	5%	SOF	190	10	(5,3) <sup>b</sup>	10 (100%)

T 1: Controle 1; T 2: Controle sem microinjeção T 3: Controle TALP microinjetado; T 4: Microinjetado lentivírus.

Valores com letras sobreescritas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças ( $P < 0,05$ ) pelo teste do qui-quadrado.

As taxas de blastocistos encontradas no D8, no presente experimento foram de 21,4%, 16,2% e 17,9% para os tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. Estas taxas não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si, mas diferiram do percentual encontrado no T4 (5,3%).

Observa-se que as taxas de blastocistos encontradas no T1 e T2 (21,4% e 16,2%, respectivamente) não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ), confirmando que as condições atmosféricas e o meio utilizado não interferiram na produção de blastocistos. Desta forma, não se pode atribuir a estes quaisquer variações nas taxas de desenvolvimento dos embriões.

As taxas obtidas em T2 e T3 (16,2 e 17,9%, respectivamente) não foram diferentes ( $P > 0,05$ ), confirmando que o procedimento de microinjeção com meio TALP (T3), que inclui a perfuração da ZP, não é capaz de causar qualquer prejuízo ao desenvolvimento embrionário. Portanto, apesar de

provocar injúrias na ZP, a microinjeção com meio TALP se mostrou incapaz de provocar qualquer efeito sobre o avanço do desenvolvimento embrionário.

Já a taxa de blastocisto de 5,26% encontrada no grupo microinjetado com lentivírus (T4) foi significativamente menor que os outros tratamentos. Deste modo, pode-se inferir que a microinjeção do lentivírus pode ter causado um efeito prejudicial ao desenvolvimento embrionário, contribuindo para uma redução nas taxas de formação de blastocistos. Estes resultados diferem dos encontrados por Chan et al. (1998), que microinjetaram vetores retrovirais do vírus Mo-MLV contendo o envelope da glicoproteína G (VSV-G) inoculado no espaço perivitelíneo de ovócitos bovinos, alcançando 21% de blastocistos nos ovócitos microinjetados. Estes mesmos autores (2001), microinjetaram vetores do vírus Mo-MLV contendo o gene GFP dentro do espaço perivitelino de ovócitos de macacos obtendo 76% de desenvolvimento embrionário.

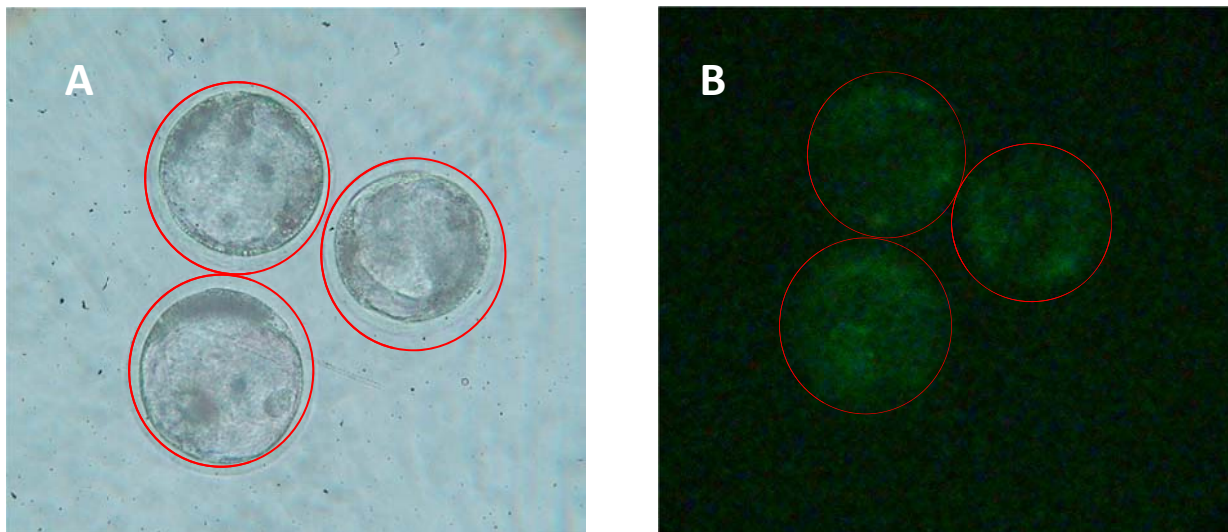
A utilização de vetores derivados do retrovírus simples, como vírus da leucemia murina de Moloney, tem resultado no aumento considerável nas taxas de transferência de genes. Entretanto, os retrovírus simples estão sujeitos a modificações epigenéticas e, eventualmente a expressão retroviral pode ser silenciada durante o desenvolvimento embrionário (JAENISCH, 1976) ou logo após o nascimento (CHAN et al., 1998). Em contraste, a utilização de vetores lentivirais resultaram em taxas de transgênese elevadas sem revelar o silenciamento gênico. Hofmann et al. (2004) conseguiram taxa de 25% de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos, microinjetando vetor lentiviral no espaço perivitelíneo de ovócitos bovinos.

A maturação nuclear dos ovócitos bovinos envolve a ruptura do envelope nuclear e a seqüência de etapas que completam a meiose I (MI) até ocorrer a extrusão do 1º corpúsculo polar, atingindo a fase de Metáfase II (MII). (OTERO, 2008). Durante o processo de injeção, os vetores lentivirais estabelecem contato com a cromatina, resultando em maior eficiência na integração do gene no genoma. Deste modo, os genes têm a probabilidade de serem inseridos antes da fecundação (CHAN et al., 1998). A partir disto, pode-se concluir que elevada eficiência deste processo tem sido associado à

ausência do envelope nuclear em ovócitos naturalmente estacionado em metáfase II meiótica (CHAN et al., 2001).

Deste modo, a baixa taxa de blastocistos obtida no grupo microinjetado com lentivírus T4, quando comparada aos outros tratamentos pode ser devido algum fator que tenha ocasionado um efeito deletério na expressão do desenvolvimento embrionário. Isto seria possível, tendo em vista que, eventualmente, os títulos de vetor e volume injetado desempenham papéis cruciais na eficiência da transferência de genes (CHAN et al., 2001).. Outro aspecto que poderia ter influenciado seria o fato de não ter calculado a titulação das partículas lentivirais o que poderia possivelmente ter contribuído para a baixa taxa de blastocisto.

Em relação à análise de expressão do gen reporter (GFP) em blastocistos derivados de lentivírus injetados nos ovócitos maduros de bovinos, foi demonstrado que o GFP foi expresso no trofotoderma bem como na massa celular interna. Portanto, em todos os embriões microinjetados (100%) foi detectada a presença do GFP (Figura 10), confirmando deste modo que procedimento de microinjeção do Lentivirus é eficiente para incorporação de um fragmento de DNA no genoma ovocitário. Estes resultados corroboram com Hofmann et al. (2003), que microinjetaram vetores lentivirais antes de fertilização *in vitro* para permitir a integração viral no genoma de bovino antes da fecundação. Este autor descreve ainda que a injeção subzonal em ovócitos maduros de bovino resultaram na expressão de GFP em 92% dos blastocistos. Posteriormente, Hofmann et al. (2004) obtiveram uma taxa de expressão de GFP em 83% dos blastocistos, resultando no nascimento de quatro bezerros transgênicos, conseguindo desta forma 100% da expressão do eGFP, demonstrando, então, a eficiência deste mecanismo.



**Figura 10: Embriões de bovinos microinjetados com vetor lentiviral**

Análise de expressão da GFP em embriões bovinos microinjetados com vetor lentiviral. Embriões no estágio de blastocisto no dia 8 (BI D8). Micrografia de campo claro (A) e de campo escuro (B) com ampliação de 100 X, tomadas durante a exposição à radiação ultravioleta no microscópio (Motic, BA400, filtro de 465-495nm). Fonte: arquivo pessoal

Para ter segurança de que as células embrionárias infectadas vão transferir os transgenes para as células filhas, a injeção subzonal é realizada o mais precocemente possível. Desta forma, mais rapidamente as células irão se desenvolver para um animal transgênico (geração F0). Neste processo, o vírus integra seu genoma nas células germinativas e o transgênico poderá ser transmitido à descendência (geração F1) (Pfeifer, 2004).

Os resultados obtidos com a produção de animais transgênicos (relacionados ao emprego de lentivetores) têm sido bastante satisfatórios e podem ser considerados promissores. Este método surge como alternativa para modificar geneticamente animais de uma forma mais rápida e rentável (PARK, 2007). A transgênese lentiviral poderia ser implementada para a produção de suínos transgênicos como modelos de doenças e de animais doadores para o xenotransplante. Os vetores lentivirais também são importantes para o melhoramento genético de animais domésticos, assim como para as pesquisas relacionadas à farmacêutica (WELLS et al., 1999; HOFMANN, 2003; PARK, 2007).

#### 4.2.2 Experimento II – Microinjeção dos zigotos seis horas pós-fecundação com vetor lentiviral

Nesse experimento, foi avaliada a capacidade de produção de embriões transgênicos de bovinos, microinjetados com vetores lentivirais no zigoto seis horas pós-fecundação. Nesta etapa experimental foram utilizados 760 ovócitos bovinos, distribuídos em quatro tratamentos. Os resultados encontram-se expostos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Produção de embriões transgênicos, pelo método de microinjeção de vetores lentivirais nos zigotos seis horas pós-fecundação

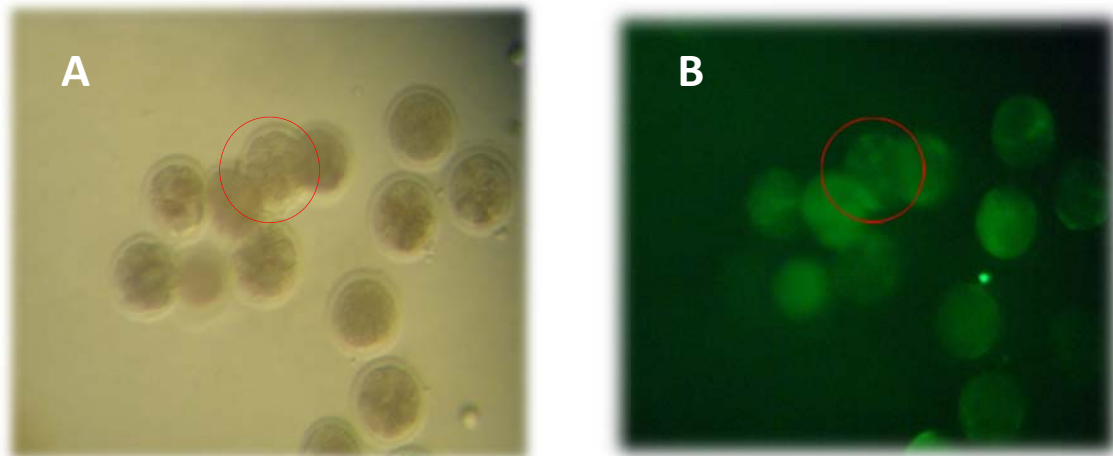
Rep	Meio	N	Clivagem*	BL D7	BLD8	D7 GFP+	D8 GFP+	
T 1	5	CR2aa	269	72,1% (194/269) <sup>a</sup>	14,5% (39/269) <sup>a</sup>	19,0% (51/269) <sup>a</sup>		
T 2	7	SOF	232	45,0% (76/169) <sup>b</sup>	10,3% (24/232) <sup>a</sup>	12,5% (29/232) <sup>b</sup>		
T 3	7	SOF	209	49,0% (75/153) <sup>b</sup>	12,4% (26/209) <sup>a</sup>	16,3% (34/209) <sup>a,b</sup>		
T 4	7	SOF	233	40,8% (69/169) <sup>b</sup>	3,4% (8/233) <sup>b</sup>	3,8% (9/233) <sup>c</sup>	75,0% (6/8)	77,8% (7/9)

T 1: Controle 1; T 2: Controle sem microinjeção; T 3: Controle TALP microinjetado; T 4: Microinjetado Lentivirus

Valores com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças ( $P < 0,05$ ) pelo teste do qui-quadrado.

Em relação às taxas de clivagem obtidas observa-se que o T1 apresentou uma maior taxa ( $P < 0,05$ ) do que a observada nos ovócitos do T2, T3 e T4, com (72,1%, 45,0%, 49,0% e 40,8%, respectivamente). Tal fato pode ser explicado pela manipulação a qual foram submetidos os possíveis zigotos, do T2, T3, T4, já que, após seis horas do início da fecundação *in vitro*, os supostos zigotos foram retirados da gota de fecundação e submetidos à remoção completa das células do *Cumulus*. Este procedimento se faz

necessário para permitir micromanipulação destes, no entanto, acaba prejudicando o desenvolvimento inicial embrionário. Entretanto, foi possível notar que os valores de clivagem mais elevados para T1 em relação aos outros tratamentos (T2 e T3) não refletiram em maiores taxas de blastocistos BI D7 entre estes tratamentos. Do mesmo modo, no T4 foi verificada a expressão do GFP simultaneamente à de observação da taxa de clivagem (Figura 11).



**Figura 11: Embriões de bovinos microinjetados com vetor lentiviral.**

Análise da expressão da GFP em embriões clivados. Micrografia de campo claro (A) e de campo escuro (B) Embriões clivados expostos à radiação ultravioleta, estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm), fluorescência verde produzida pela GFP. Aumento 40X. Fonte: arquivo pessoal.

Observa-se que a taxa de blastocistos no dia 8 (BL D8) para os ovócitos fecundados do T1 (19,0%) e do T3 (16,3%) foi superior ( $P < 0,05$ ) que a observada nos outros tratamentos. Na verdade, o valor superior de T1 no D8 é um reflexo das maiores taxas de clivagem e maiores taxas de blastocistos apresentadas anteriormente nos dias três e sete, respectivamente. A taxa superior do T1 pode ser explicada pelo fato que este grupo controle não foi sometido a nenhuma manipulação tanto de remoção das células do *cúmulos* como também permaneceram por 20 horas co-incubados com os espermatozoides enquanto os grupos T2, T3 e T4, somente permaneceram por seis horas co-incubados com os espermatozoides. A similaridade entre as taxas de BL no D8 entre o T2 e T3 indicam que o procedimento de microinjeção com meio TALP (T3) não foi capaz de causar danos aos embriões, a ponto de interferir no seu desenvolvimento, quando são

comparados ao desenvolvimento no D8. Portanto, mesmo provocando um dano localizado (perfuração da ZP), acredita-se que esse procedimento não seria capaz de provocar morte embrionária. Entretanto, quando são comparados o T2 e T3 com o grupo microinjetado com lentivirus (T4), cultivados em mesma atmosfera gasosa e utilizando os mesmos meios de cultivo, pode-se notar que os valores significativamente menores de T4 não estão relacionados ao mecanismo de microinjeção mas sim à presença das partículas de lentivirus. A partir deste fato pode-se inferir que esta partícula, quando inoculada em zigoto, se mostra prejudicial ao desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto inicial. No entanto, a transgênese lentiviral pela infecção dos zigotos têm sido ajustada para algumas espécies alvo. Os primeiros estudos usando vetores lentivirais microinjetados em zigotos relataram uma maior eficiência para gerar roedores (LOIS et al., 2002; PFEIFER et al., 2002) e suínos transgênicos (WHITELAW et al., 2004; HOFMANN et al., 2003).

Em contraste, transferência de genes em zigotos bovinos, bem como em zigotos de primatas ainda não apresentaram resultados satisfatórios (WOLFGANG et al., 2001; PFEIFER, 2004). A baixa eficácia de transgênese lentiviral em macacos resultou na transferência de genes apenas em tecidos extra-embriônicos (WOLFGANG et al., 2001). Já em bovinos, Hofmann et al. (2004) injetaram vetores lentivirais no espaço perivitelino de zigotos e apenas 22% dos zigotos infectados desenvolveram até o estágio de blastocistos, resultando, no nascimento de quatro bezerros mas nenhum deles transgênico. Nesse estudo, a possível causa da baixa eficiência pode ter sido a idade dos zigotos que foram utilizados tendo em vista que os zigotos foram utilizados 18h após a fecundação *in vitro*.

Sabe-se que a penetração espermática durante a fecundação *in vitro* inicia-se com quatro horas de cultivo, a formação dos pronucleus inicia-se com quatro horas e dura até 11 horas enquanto a síntese de DNA (fase S) inicia-se com 14 a 15 horas pós-fertilização com duração de 8 a 10 horas (LAURINCİK et al., 1998). Neste sentido, deve-se considerar a influência da fase do ciclo celular e do estado da cromatina sobre a integração de retrovírus. Alguns retrovírus, como o HIV, podem se integrar em células que não estão se dividindo, mas a cromatina descondensada ou aberta pode facilitar o acesso e

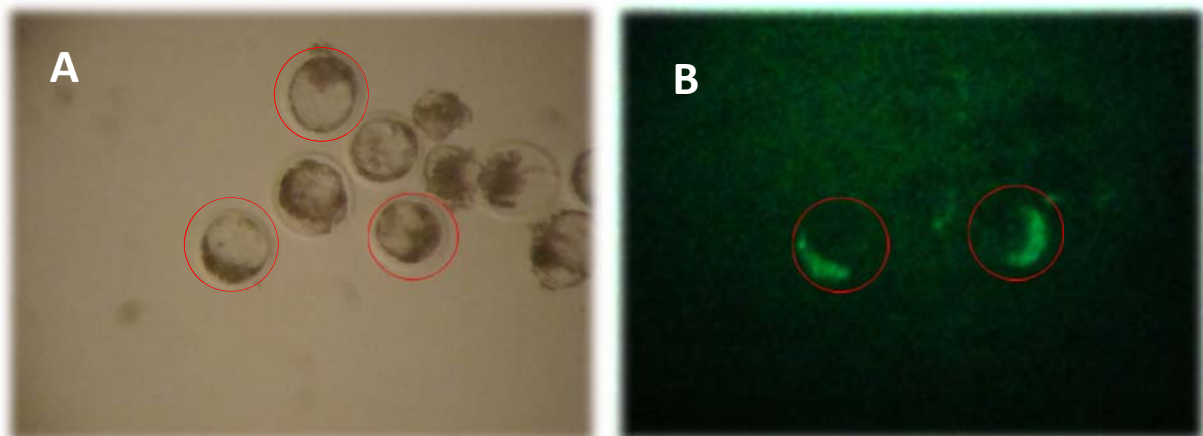
a integração correta do genoma viral (BUSHMAN et al., 2005, CIUFFI e BUSHMAN, 2006).

Ao se considerar um zigoto, os vetores lentivirais teriam uma integração mais eficiente entre 14 a 24 horas após início da fecundação, na fase S, onde os sítios de integração estariam acessíveis. Para isso, os zigotos deveriam ser expostos aos vetores antes das 14 horas, ao contrário do avaliado no trabalho de Hofmann et al. (2004). Este pode ser uma dos motivos pelo qual o uso dos vetores em ovócitos maturados, seguidos da fecundação, foram mais eficientes. Dessa maneira, acredita-se que uma das possíveis razões para a ineficiente transdução dos zigotos bovina poderia ser pelo genoma lentiviral não ser capaz de penetrar de forma eficiente no pronúcleo bovino (PFEIFER, 2004). É provável que no caso dos zigotos bovinos, a integração lentiviral poderia ser significativamente retardada na presença de uma membrana nuclear (NALDINI et al., 1996; HOFMANN et al., 2004). Outra possível explicação para a baixa eficiência é que a infecção retroviral pode atrasar a clivagem dos embriões, diminuindo assim a capacidade de integração do complexo de pré-integração (CHAN, 1998). Isto pode ser um dos motivos pelo qual o uso dos vetores em ovócitos maturados, seguidos da fecundação, foram mais eficientes. Estes achados corroboram com os resultados encontrados no presente experimento.

O fato de T4 apresentar as taxas de blastocistos no D7 e no D8 inferior aos outros tratamentos pode ser explicada, pelo fato do vetor lentiviral ter causado, provavelmente, um efeito deletério na formação de blastocistos. Isto foi anteriormente confirmado por Chan et al. (2001) e por Wolfgang et al. (2001) que relataram que as diferenças biológicas de cada espécie animal assim como aspectos básicos da técnica como o tempo, o ponto-de injeção e a quantidade do título lentiviral usado para a microinjeção. Estas condições podem representar um aspecto negativo no desenvolvimento embrionário quando inocula-se o vetor lentiviral. Entretanto, alguns estudos indiquem que a expressão da GFP pode reduzir a viabilidade ou interferir no desenvolvimento de embriões transfectados (Hanazono et al., 1997).

Diferentemente de quando inoculado em ovócitos, os genes do GFP não são totalmente expressos em blastocistos quando estes são micorinjetados em zigotos. No presente estudo, foi possível evidenciar que este gen foi expresso

em BI 7d e BI 8d em 75,0 e 77,8% dos casos, respectivamente. Apesar da maioria dos embriões expressar esse gen marcador, pode-se observar que algumas estruturas acabam não expressando-o (Figura 12). Esses achados corroboram com Hofmann et al. (2003), que ao microinjetar vetores lentivirais em zigotos de suínos conseguiram 70% de leitões nascidos vivos transportando o transgene, sendo que 65% destes suínos expressavam a GFP. Estes mesmos autores relataram 45% da expressão da GFP em blastocistos de embriões bovinos. Já Lois et al. (2002) conseguiram 90% da expressão do GFP em pelo menos 80% dos camundongos transgênicos gerados. Whitelaw et al. (2004) geraram suínos transgênicos utilizando vetores lentivirais desenvolvidos a partir do genoma da anemia infecciosa equina, obtendo 31% de animais transgênicos a partir de zigotos injetado com vírus no espaço perivitelino e 95% dos animais fundadores exibindo fluorescência verde.



**Figura 12: Embriões de bovinos microinjetados com vetor lentiviral.**

Análise de expressão da GFP em embriões bovinos microinjetados com vetor lentiviral. Embriões no estágio de blastocisto no dia 7 (BL D7). Micrografia de campo claro (A) e de campo escuro (B) Embriões expostas à radiação ultravioleta, estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm) fluorescência verde produzida pela GFP. Aumento 40X. Fonte: arquivo pessoal.

A expressão do GFP pode ser uma ferramenta interessante para resolver uma infinidade de perguntas na biotécnicas e na biologia do desenvolvimento embrionário. Pode ser usado para estudar as modificações epigenéticas, tais como a metilação do DNA (HOFMANN et al., 2006; REICHENBACH et al., 2010). Além disso, é uma tecnologia promissora para

estudar os processos biológicos já que permite uma visualização precisa da estrutura anatômica dos animais transgênicos expressando gene (eGFP), com o fim de obter acesso a órgãos e tecidos *in vivo* (AL-GUBORY e HOUEBINE 2006). Outra importante aplicação da expressão da GFP em embriões bovino transgênico é a investigação das interações materno-embriônica (SPENCER et al., 2008; BAUERSACHS et al., 2009).

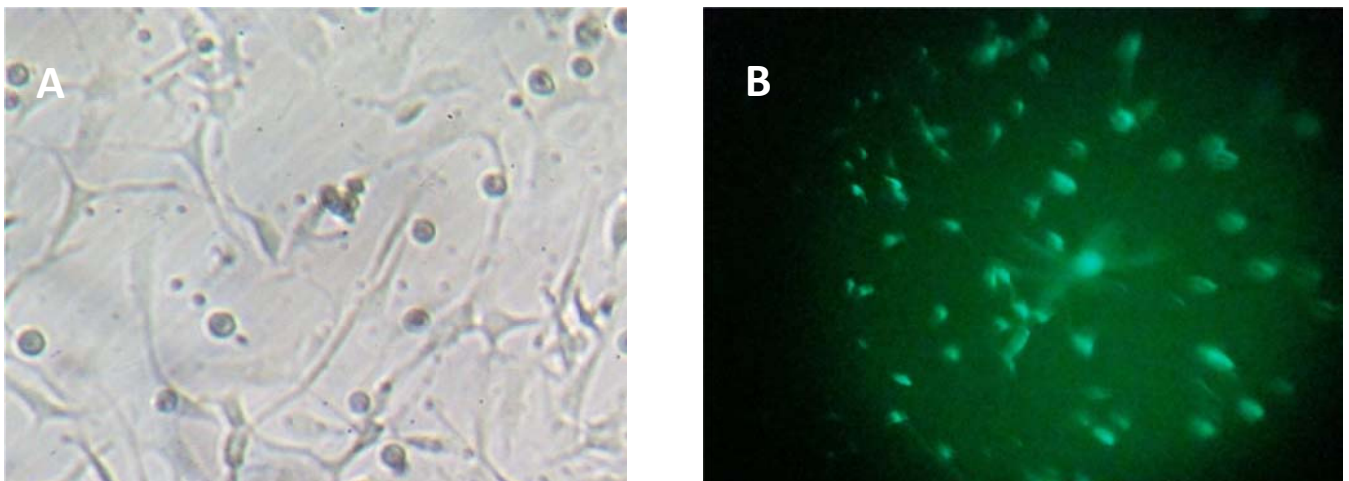
Em estudo recente, Reichenbach et al. (2010), investigaram a transmissão de GFP através da linha germinal masculina e feminina em bovinos. Uma fêmea transgênica fundadora foi submetida a tratamento de superovulação e inseminação com sêmen de um touro não transgênico, resultando no nascimento de um bezerro transgênico expressando GFP. Também foi utilizado o sêmen de um touro transgênico fundador para realizar a FIV, em ovócitos de vacas não-transgênicas. Assim, 93% dos blastocistos produzidos da fertilização *in vitro* expressaram o GFP. Isto culminou no nascimento de um bezerro transgênico expressando alto nível consistente de GFP. Desta forma, foi demonstrando que o padrão de herança da integração lentiviral na linha germinativa de animais fundadores é consistente com as regras mendelianas. Já Wang et al. (2010) constataram que o nível de expressão GFP é capaz de se manter relativamente constante pelo menos em sete gerações de camundongos transgênicos.

#### **4.2.3 EXPERIMENTO III. Efeito da tricostatina em embriões clones modificados geneticamente com GFP**

Para a realização deste experimento, os fibroblatos bovinos transgênicos foram produzidos a partir da transfecção com vetor lentiviral contendo o transgene GFP (Figura 13), os quais foram cultivados até a 12 passagem e criopreservados em DMSO. Antes da TNCS as células foram descongeladas e cultivadas por 24 h. As células que se apresentavam positivas para GFP foram usadas como doadoras de núcleo nos embriões tratados ou não com tricostatina.

Os resultados da tradução viral em células dependem de diversos fatores, como concentração celular inicial plaqueada, tipo celular, concentração

viral adicionada ao cultivo, entre outros. Assim como nas transfecções, portanto, a positividade de células expressando o transgene após a tradução é variável (BRESSAN et al., 2008b). Essa característica permite a quantificação, o posicionamento genômico e a confirmação da expressão do transgene, possibilitando o estabelecimento de linhagens de interesse. Assim, quando as célulasadoras transfectadas são adequadamente selecionadas, levam eventualmente ao nascimento de proles exclusivamente portadoras da modificação genética (BORDIGNON et al., 2003; HYUN et al., 2003; LISAUSKAS et al., 2007; BRESSAN et al., 2008). Em um estudo conduzido por Tang et al. (2012), fibroblastos transgênicos para uso em transferência nuclear (TN) foram gerados por transfecção lentiviral em ovelhas. O presente estudo mostrou que 99,4% das células trasfectadas exibiram fluorescência verde. Ainda observou-se que cerca de 20% os ovócitos reconstruídos desenvolveram até estágio de mórula, expressando GFP.



**Figura 13: fibroblastos de bovinos modificados geneticamente com GFP.** (A) Células doadoras de núcleo (Fibroblastos) modificadas geneticamente, campo claro. (B) Imagem referente à fluorescência verde produzida pela GFP, expostas à radiação ultravioleta estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm). Aumento 40X. Fonte: arquivo pessoal.

Neste experimento, foi avaliado o efeito do tratamento da TSA sobre o desenvolvimento de embriões clones bovinos, reconstruídos com células somáticas geneticamente modificadas com GFP. A tabela 3 mostra os resultados de clivagem, produção de blastocistos e taxa de embriões expressando a proteína GFP. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de

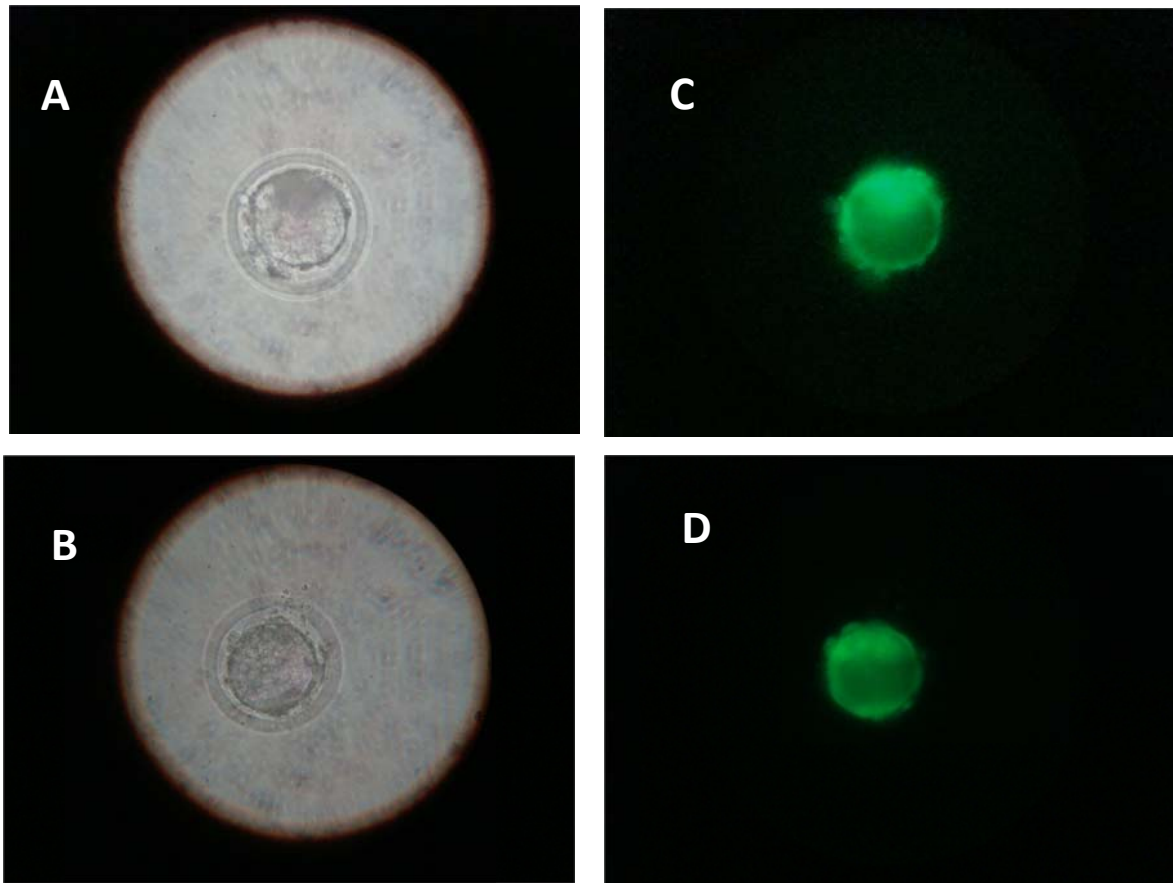
blastocistos de embriões clones tratados com tricostatina (18,1%) quando comparada com embriões não tratados (6,8%). Quando a taxa foi calculada a partir de zigotos clivados, a produção foi superior ( $P < 0,05$ ) para os embriões tratados com tricostatina. Em ambos tratamentos, todos blastocistos gerados expressaram a proteína GFP, ao contrário dos embriões partenogênicos. A Figura 14 mostra blastocistos clones tratados com tricostatina e expressando o GFP.

**Tabela 3.** Desenvolvimento *in vitro* de embriões clones transgênicos tratados com inibidor de histona deacetilase (tricostatina) nas 11-12 primeiras horas após reconstrução

Tratamento	Nº	Clivagem (%)	Blastocistos (%)	Blastocistos sobre clivados	Proporção de embriões GFP+
NT-Trico	49	66,1±14,4 <sup>a</sup>	18,1±4,0 <sup>a</sup>	26,7±3,8 <sup>a</sup>	100%
NT	55	72,9±11,3 <sup>a</sup>	6,8±2,3 <sup>a</sup>	10,3±3,6 <sup>b</sup>	100%

NT-Trico: embriões clones submetidos à tricostatina; NT: embriões clones não submetidos à tricostatina. Valores com letras sobrescritas diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos.

Observa-se neste estudo que o tratamento com a tricostatina apresentou um efeito positivo sobre o desenvolvimento de embriões modificados geneticamente, ao contrário do observado com embriões clones modificação genética sem o tratamento com tricostatina. A. Bordignon et al. (2003) modificaram fibroblastos fetais de bovinos com a proteína verde fluorescente (GFP) utilizando fibroblastos como células dadoras de núcleo na reconstrução ovocitaria. Estes pesquisadores observaram que o GFP tornou-se detectável na fase de 8 - para 16 células, e manteve-se positiva em todas as fases posteriores. Após o nascimento os bezerros clonados apresentaram um desligamento parcial da expressão da GFP, sugerindo um silenciamento irreversível de transgenes.



**Figura 14. Embriões clones tratados com tricostatina e expressando a proteína GFP.** (A-B) Embriões clones transgênicos, campo claro. (C-D) Embriões clones transgênicos, expostas à radiação ultravioleta. Fluorescência verde produzida pela GFP. Fonte: arquivo pessoal.

Alguns estudos relataram que a produção de embriões é menos eficiente quando se usa células geneticamente modificadas (ZAKHARTCHENKO et al., 2001; ARAT et al., 2002,). Isso pode ser devido não somente a modificação genética, mas também devido ao processo de indução da modificação e seleção das células modificadas. Neste procedimento, as células são cultivadas por diversas passagens a fim de confirmar o sucesso da transgenia e estabelecimento da linhagem celular. Contudo, o cultivo por longo tempo pode prejudicar a viabilidade da célula, causando alterações cromossômicas ou mesmo interferir na reprogramação do núcleo. O uso da tricostatina neste tipo de células pode ser mais favorável ao desenvolvimento do embrião clone quando comparado com as células jovens, com poucas passagens cultivo. Outro ponto a ser observado é que as células doadoras geneticamente modificadas não foram induzidas à quiescência como as células sem modificação genética. Apesar de estudos terem relatos que a quiescência não

é necessária para o sucesso das TNCS (CIBELLI et al., 1998; VIGNON et al., 1999), a tricostatina pode favorecer a reprogramação nas células transgênicas sem indução da quiescência. Neste sentido, Lager et al. (2008) utilizaram TSA, para observar o efeitos que tinha sobre o desenvolvimento e na acetilação das histonas de embriões clonados de bovinos pré-implantados. Eles perceberam que o tratamento com TSA em embriões TNCS resultou numa taxa de desenvolvimento semelhante à do tratamento controle aos embriões produto da fertilização *in vitro* e significativamente maior do (embriões clones não tratados com TSA). Os dados aqui apresentados demonstram que a TSA pode melhorar o desenvolvimento embrionário de clones de bovinos.

## 5 CONCLUSÕES

A microinjeção do vetor lentiviral nos ovócitos bovinos antes da fecundação diminuiu a taxa de desenvolvimento embrionário.

A microinjeção do vetor lentiviral nos zigotos seis horas pós-fecundação resulta em baixa taxa de desenvolvimento embrionário.

A adição do marcador GFP nos vetores lentivirais, facilita a identificação de embriões transgênicos de bovinos, a partir da clivagem.

A transferência gênica mediada por microinjeção de vetores lentivirais nos ovócitos e zigotos de bovinos resulta na expressão da proteína fluorescente verde GFP.

A tricostatina A promove aumento da produção de embriões clones gerados de células geneticamente modificadas, sem interferir na expressão do transgene durante o período pré-implantacional.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-GUBORY, K. H.; HOUDEBINE, L. -M. *In vivo* imaging of green fluorescent protein-expressing cells in transgenic animals using fibred confocal fluorescence microscopy. **European Journal of Cell Biology**, 85, p. 837-845, 2006.
- ARAT, S.; RZUCIDLO, S. J.; GIBBONS, J.; MIYOSHI, K.; STICE, S. L. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 20-26, 2001.
- ARAT, S.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, S. J.; RESPESS, D. S.; TUMLIN, M.; STICE, S. L. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1768–1774, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Transgênicos e evolução dirigida. **História, Ciências, Saúde**, Manguinhos, v. 7, n. 2, out. 2000.
- BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; ZAKHARTCHENKO, V.; MINTEN, M.; REICHENBACH, M.; REICHENBACH, H. D.; BLUM, H.; SPENCER, T. E.; WOLF, E. The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 5681-5686, 2009.
- BLESCH, A. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. **Methods**, v. 33, p. 164-172, 2004.
- BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BILODEAU, A. S.; PONTES, J. H.; ARNOLD, D.; FECTEAU, G.; KEEFER, C.; SMITH, L. C. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2013-2023, 2003.
- BRESSAN, F. F. **Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- BRESSAN, F. F.; MIRANDA, M. S.; DE BEM, T. H. C.; PEREIRA, F. T. V.; BINELLI M.; MEIRELLES, F. V. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 240-250, out./dez. 2008b.

- BRESSAN, F. F.; PERECIN, F.; SANGALLI, J. R.; MEIRELLES, F. V. Reprogramming somatic cells: pluripotency through gene induction and nuclear transfer. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39(Suppl 1), p. s83 - s95, 2011.
- BUCHSCHACHER, G. L.; WONG-STAAAL, F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. **Blood**, v. 95, p. 2499-2504, 2000.
- BUCHSCHACHER, G. L. Introduction to Retroviruses and Retroviral Vectors. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 26, n. 1-6, 2001.
- BUKRINSKY, M. I.; SHAROVA, N.; DEMPSEY, M. P.; STANWICK, T. L.; BUCKINSKAYA, A. G.; HAGGERTY, S.; STEVENSON, M. Active nuclear import of human HIV type 1 pre integration complex. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 89, p. 6580-6584, 1992.
- BUKRINSKY, M. I.; HAGGERTY, S.; DEMPSEY, M. P.; SHAROVA, N.; ADZHUBEL, A.; SPITZ, L.; LEWIS, P.; GOLDFARB, D.; EMERMAN, M.; STEVENSON, M. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. **Nature**, v. 365, p. 666-669, 1993.
- BURNS, J. C.; FRIEDMANN, T.; DRIEVER, W.; BURRASCANO, M.; YEE, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 90, p. 8033-8037, 1993.
- BUSHMAN, F.; LEWINSKI, M.; CIUFFI, A.; BARR, S.; LEIPZIG, J.; HANNENHALLI, S.; HOFFMANN, C. Genome wide analysis of retroviral DNA integration. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 848-858, 2005.
- CAMPBELL, K. H. S.; FISHER, P.; CHEN, W. C.; CHOI, I.; KELLY, R. D. W.; LEE, J-H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives, **Theriogenology** , v. 68(Supl 1), p. S214-S23, 2007.
- CERVERA, R. P.; MARTÍ-GUTIÉRREZ, N.; ESCORIHUELA, E.; MORENO, R.; STOJKOVIC, M. Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. **Theriogenology**, v. 72, p. 1097-1110, 2009.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CHAN, A. W. S.; HOMAN, E. J.; BALLOU, L. U.; BURNS, J. C.; BREMEL, D. R. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 95, p. 14028-14033, 1998.

- CHAN, A. W.; CHONG, K. Y.; MARTINOVICH, C.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. **Science**, v. 291, n.5502, p 309-312, 2001.
- CHAPMAN, S. C.; LAWSON, A.; MACARTHUR, W. C.; WIESE, R. J.; LOECHEL, R. H.; BURGOS-TRINIDAD, M.; WAKEFIELD, J. K.; RAMABHADRAN, R.; MAUCH, T. J.; SCHOENWOLF, G. C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. **Development**, v. 132, n. 5, p. 935-940, 2005.
- CHOI, Y. H.; LEE, B. C.; LIM, J. M.; KANG, S. K.; HWANG, W. S. Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. **Theriogenology**, v. 58, p. 1187-1197, 2002.
- CIUFFI, A.; BUSHMAN, F. D. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. **Trends in Genetics**, v. 22, p. 388-395, 2006.
- CIBELLI JB, STICE SL, GOLUEKE PJ, KANE JJ, JERRY J, BLACKWELL C, PONCE DE LEON FA, ROBL JM. Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256-1258, 1998.
- CLARK, A. Generation of transgenic livestock by pronuclear injection. **Methods in Molecular Biology**, v. 180, p. 273-287, 2002.
- COCKRELL, A. S.; KAFRI, T. Gene delivery by lentivirus vectors. **Molecular Biotechnology**, v. 36, p. 184-204, 2007.
- COFFIN, J. M. **The Viruses and their Replication**. In: CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P. Fields Virology, 3rd Ed, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1767-1847, 1996.
- COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, E. H. **Retrovíruses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- COLLARES, T.; BONGALHARDO, D. C.; DESCHAMPS, J. C.; MOREIRA, H. L. M. Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction. **Animal Reproduction**, v. 2, p.11-27, 2005.
- COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V.; DESCHAMPS, J. C. Animais transgênicos biorreatores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 4, p. 462-478, 2007.
- COSTA, E. P.; VALE FILHO, V. R.; NOGUEIRA, J. C. Técnica para a avaliação do estágio de maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n. 4, p. 433-440, 1997.
- DALBA, C.; BELLIER, B.; KASAHARA, N.; KLATZMANN, D. Replication Competent Vectors and Empty Virus-like particles: New Retroviral Vector

- Designs for cancer gene therapy or vaccines. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 3, p. 457-466, 2007.
- DANN, C. T.; ALVARADO, A. L.; HAMMER, R. E.; GARBERS, D. L. Heritable and stable gene knockdown in rats. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, p. 11246-11251, 2006.
- DE SOULTRAIT, V. R.; CAUMONT, A.; DURRENS, P.; CALMELS, C.; PARISSI, V.; RECORDON, P.; BON, E.; DESJOBERT, C.; TARRAGO-LITVAK, L.; FOURNIER, M. HIV-1 integrase interacts with yeast microtubule-associate proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1575, n. 1-3, p. 40-48, mai. 2002.
- DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 93-100, 2003.
- DULL, T.; ZUFFEREY, R.; KELLY, M.; MANDEL, R. J.; NGUYEN, M.; TRONO, D.; NALDINI, L. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8463-8471, 1998.
- ENRIGHT, B. P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2 $\beta$ -deoxycytidine. **Biololy of Reproduction**, New York, v. 69, p. 896-901, 2003.
- ENRIGHT, B. P.; JEONG, B. S.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. **Biololy of Reproduction**, v. 69, p. 1525-1530, 2003b.
- EYESTONE, W. H. Production and breeding of transgenic cattle using *in vitro* embryo production technology. **Theriogenology**, v. 51, p. 509-517, 1999.
- FAIRBURN, H. R.; YOUNG, L. E.; HENDRICH, B. D. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? **Current Biololy**, v. 12, p. R68-R70, 2002.
- FAN, J.; WATANABE, T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 261-282, 2003.
- FEITOSA, W. B.; MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Transferência gênica mediada por espermatozoides. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 35, p. 8-14, 2005.
- FELMER, R. B. Q. Animales transgênicos: pasado, presente y futuro. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 36, n. 2, p. 105-117, 2004.
- GAO, S. R.; MCGARRY, M.; FERRIER, T.; PALLANTE, B.; GASPARRINI, B.; FLETCHER, J.; HARKNESS, L.; DE SOUSA, P.; MCWHIR, J.; WILMUT, I.

- Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 595-603, 2003.
- GAO, X.; KIM, K. S.; LIU, D. Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 92-104, 2007.
- GOFF, S. P. Genetic Control Of Retrovirus Susceptibility In mammalian Cells. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 61-85, 2004.
- GOMEZ CORREDOR, A. ; CLAUDE, M.; LOUIS, S. T.; ARCHAMBAULT, D. Molecular and Biological Aspects of the Bovine Immunodeficiency Virus. **Current HIV Research**, v. 8, n.1, 2010.
- GONSALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicada à reprodução animal**. São Paulo, ed. Roca, p. 281-294, 2001.
- GORDON, J. W.; SCANGOS, D. J.; PLOTKIN, J. A.; BARBOSA, J. A. ; RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 7380-7384, 1980.
- GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIM, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 59-74, 1977.
- HANAZONO, Y. ; YU, J. M.; DUNBAR, C. E.; EMMONS, R. V. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. **Human Gene Therapy**, v. 8, p. 1313-1319, 1997.
- HASKELL, R.; BOWEN, R. A. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. **Molecular and Reproduction Development**, v. 40, p. 386-390, 1995.
- HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LÉBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses From Cattle Cloned Embryos. **Biology of Reproduction**. v 66, p. 6-13, 2002.
- HIRIPI, L.; NEGRE, D.; COSSET, F. L.; KVELL, K.; CZOMPOLY, T.; BARANYI, M.; GOECZA, E.; HOFFMANN, O.; BENDER, B.; BOSZE, Z. S. Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. **Transgenic Research**, v. 19, p. 799-808, 2010.
- HOFMANN, A.; KESSLER, B.; EWERLING, S.; WEPPERT, M.; VOGG, B.; LUDWIG H.; STOJKOVIC, M.; BOELHAUVE, M.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. **EMBO Reports**, v. 4, n. 11, p. 1054-1060, 2003.

- HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biololy of Reproduction**, v. 71, n. 2, p 405-409, 2004.
- HOFMANN, A.; KESSLER, B.; EWERLING, S.; KABERMANN, A.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 1, 2006.
- HOUEBINE, L. M. Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Research**, v. 9, p. 305-320, 2000.
- HOUEBINE, L. M. Transgenesis to improve animal production. **Livestock Production Science**, v. 74, p. 255-268, 2002.
- HOUEBINE, L. M. Animal transgenesis: recent data and perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 1137-1141, 2002b.
- HOUEBINE, L. M. **Métodos de gerar animais transgênicos e controle da expressão gênica**. In: COLLARES, T. Animais transgênicos: Princípios e Métodos. Botucatu, SBG, p. 81-114, 2005.
- HYUN, S.; LEE, G.; KIM, D.; KIM, H.; LEE, S.; NAM, D.; JEONG, Y.; KIM, S.; YEOM, S.; KANG, S.; HAN, J.; LEE, B.; HWANG, W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. **Biololy of Reproduction**, v.69, p. 1060-1068, 2003.
- IAGER, A. E.; RAGINA, N. P.; ROSS, P. J.; BEYHAN, Z.; CUNNIFF, K.; RODRIGUEZ, R. M.; CIBELLI, J. B. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. **Cloning Stem Cells**, v. 10, p. 371-379, 2008.
- IANNACCONE, P.; TABORN, G.; GARTON, R. Preimplantation and postimplantation development of rat embryos cloned with cumulus cells and fibroblasts. **Zygote**, v. 9, p. 135-143, 2001.
- IWAKUMA, T.; CUI, Y.; CHANG, L. J. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. **Virology**, v. 261, p. 120-132, 1999.
- IWAMOTO, D.; SAEKI, A. K.; KISHIGAMI, A. B. S.; KASAMATSU, A.; TATEMIZO, A. A.; ABE, Y. et al. Effects of trichostatina on development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Reprod Fert Dev.**, v. 19, p. 142, 2007. Abstract.
- IWAMOTO, D.; KISHIGAMI, S.; TANIGUCHI, S.; ABE, Y.; MATSUI, T., KASAMATSU, A.; TATEMIZO, A. ET AL. Effects of trichostatin A on DNA methylation in cloned bovine embryos. **Reprod Fert Dev.**, v. 20, p. 99, 2008. Abstract.

- JAENISCH, R.; HARBERS, K.; JAHNER, D.; STEWART, C.; STUHLMANN, H. DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 20, p. 331-336, 1982.
- JAENISCH, R.; MINTZ, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 71, p. 1250-1254, 1974.
- JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 73, p. 1260-1264, 1976.
- JAHNER, D.; JAENISCH, R. Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. **Nature**, v. 315, p. 594-597, 1985.
- JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 99-107, 1999.
- JOHNSTONE, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 287-299, 2002.
- KANG, Y. K.; KOO, D. B.; PARK, J. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, A. S.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nature Genetics**, v. 28, p. 173-177, 2001.
- KE, N.; ZHOU, D.; CHATTERTON, J. E.; LIU, G.; CHIONIS, J.; ZHANG, J.; TSUGAWA, L.; LYNN, R.; YU, D.; MEYHACK, B.; WONG-STAAAL, F.; LI, Q. X. A new inducible RNAi xenograft model for assessing the staged tumor response to mTOR silencing. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2726-2734, 2006.
- KIM, V. N.; MITROPHANOUS, K.; KINGSMAN, S. M.; KINGSMAN, A. J. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v. 72, p. 811-816, 1998.
- KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; THUAN, N. V.; WAKAYAMA, S.; BUI, H. T.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 183-189, 2006.
- KOTSOPOULOU, E.; KIM, V. N.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M.; MITROPHANOUS, K. A. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. **Journal of Virology**, v. 74, p. 4839-4852, 2000.

- KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 286-294, 2004.
- KUES, W. A.; NIEMANN, H. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 146-156, 2011.
- KVELL, K.; CZOMPOLY, T.; HIRIPI, L.; BALOGH, P.; KOBOR, J.; BODROGI, L.; JUDIT, E.; PONGRACZ, J. E.; RITCHIE, W.; BOSZE, Z. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. **Transgenic Research**, v. 19, p. 105-112, 2010.
- LACHAM-KAPLAN, O.; TROUNSON A. Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. **Human Reproduction**, v. 10, p. 2642-2649, 1995.
- LAURINCÍK, J.; HYTTEL, P.; BARAN, V.; ECKERT, J.; HAHN, A. L.; PIVKO, J.; NIEMANN, H.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cellcycle chronology and ultrastructure. **Molecular and Reproduction Development**, v. 50, p. 192-199, 1998.
- LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M.; DOLCI, S.; FARACE, M. G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign dna into eggs - genetic-transformation of mice. **Cell**, v.57, p.717-723, 1989.
- LEE, G. S.; KIM, H. S.; HYUN, S. H.; LEE, S. H.; JEON, H. Y.; NAM, D. H.; JEONG, Y. W.; KIM, S.; KIM, J. H.; HAN, J. Y.; AHN, C.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Production of transgenic cloned pigs from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. **Theriogenology**, v.63, p. 973-991, 2005.
- LEROUX, C.; MORNEX, J. F. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 68-76, 2008.
- LEWIS, P. F.; EMERMAN, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 68, p. 510-516, 1994.
- LISAUSKAS, S. F.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. Characterization of transgene integration loci in transformed Madin Darby bovine kidney cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p.456-460, 2007.
- LIU, Z. H.; SONG, J.; WANG, Z. K.; TIAN, J. T.; KONG, Q. R.; ZHENG, Z.; YIN, Z.; GAO, L.; MA, H. K.; SUN, S.; LI, Y. T.; WANG, H. B.; PRATHER, R. S. Green fluorescent protein (GFP) transgenic pig produced by somatic cell nuclear transfer. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 7, p.1035-1039, 2008.
- LOIS, C.; HONG, E. J.; PEASE, S.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 868-872, 2002.

- LUZARDO, J. E. L. El cerdo transgénico: curiosidad científica o realidad médica. **Academia Colombiana de Ciencias Veterinarias**, v. 2, 2010.
- MCCREATH, K. J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K. H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A.E.; KIND, A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v. 2, p. 408, 2000.
- MCGREW, M. J.; SHERMAN, A.; ELLARD, F. M.; LILLICO, S. G.; GILHOOLEY, H. J.; KINGSMAN, A. J.; MITROPHANOUS, K. A.; SANG, H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **EMBO Reports**, v. 5, n. 7, p. 728-733, 2004.
- MERIGHE, G. K. F.; MIRANDA, M. D. S.; DE BEM, T. H. C.; WATANABE, Y. F.; MEIRELLES, F. V. Efeito do número da passagem e do gênero das células doadoras de núcleo no desenvolvimento de bovinos produzidos por transferência nuclear. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.10, p. 2166-2173, 2010.
- MIAO, K.; GUO, M.; AN, L.; XU, X. L.; WU, H.; WANG, D.; WU, Z. H.; TIAN, J. H. A new method to efficiently produce transgenic embryos and mice from low-titer lentiviral vectors. **Transgenic Research**, v. 20, p. 357-363, 2011.
- MIYOSHI, H.; BLOMER, U.; TAKAHASHI, M.; GAGE, F.H.; VERMA, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of Virology**, v. 72, p. 8150-8157, 1998.
- MIYOSHI, H.; SMITH, K. A.; MOSIER, D. E.; VERMA, I. M.; TORBETT, B. E. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. **Science**, v. 283, p. 682-686, 1999.
- MOFFAT, J.; GRUENEBERG, D. A.; YANG, X.; KIM, S. Y.; KLOEPFER, A. M.; HINKLE, G.; PIQANI, B.; EISENHAURE, T. M.; LUO, B.; GRENIER, J. K.; CARPENTER, A. E.; FOO, S. Y.; STEWART, S. A.; STOCKWELL, B. R.; HACHOEN, N.; HAHN, W. C.; LANDER, E. S.; SABATINI, D. M.; ROOT, D. E. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. **Cell**, v. 124, p. 1283-1298. 2006
- MOISYADI, S.; JOSEPH, M.; KAMINSKI, J. M.; YANAGIMACHI, R. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, p.47-60, 2009.
- MOURA, R. R.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F. Production of recombinant proteins in milk of transgenic and non-transgenic goats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 927-938, 2011.
- NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M.; TRONO, D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, p. 263-267, 1996.

- NALDINI, L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 457-463, 1998.
- NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414-421, 2010.
- NISOLE, S.; SAÏB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v. 1, n. 9, 2004.
- OH, T.; BAJWA, A.; JIA, G.; PARK, F. Lentiviral vector design using alternative RNA export elements. **Retrovirology**, v. 4, n. 38, 2007.
- OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, L. Z.; SARAIVA, N. Z.; MONTEIRO, F. M.; GARCIA, J. M. Efeitos da tricostatina A sobre a acetilação de histonas, proliferação celular e diferenciação de células tronco embrionárias murinas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011.
- ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T.; MIKAWA, S.; TAKEDA, K.; AWATA, T.; HANADA, H.; PERRY, A. C. F. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science**, v. 289, p. 1188-1190, 2000.
- OTERO, A. R. J. **Classificação de Ovócitos Imaturos de Bovinos pela Utilização do Azul Cresil Brilhante**. 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- PAGE, K. A.; LANDAU, N. R.; LITTMAN, D. R. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. **Journal of Virology**, v. 64, p. 5270-5276, 1990.
- PAILLART, J. C.; MARQUET, R.; SKRIPKIN, E.; EHRESMANN, C.; EHRESMANN, B. Dimerization of retroviral genomic RNAs: Structural and functional implications. **Biochimie**, v. 78, p. 639-653, 1996.
- PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E.; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD, M. G.; BIRNBERG, N. C.; EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein-growth hormone fusion gene. **Nature**, v. 300, p. 611-615, 1982.
- PARK, F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? **Physiological Genomics**, v. 31, p. 159-173, 2007.
- PAROLIN, C.; DORFMAN, T.; PALU, G.; GOTTLINGER, H.; SODROSKI, J. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 68, p. 3888-3895, 1994.
- PATTERSON, G. H. A new harvest of fluorescent proteins. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1524-1525, 2004.

- PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118-128, jul./set. 2009.
- PFEIFER, A.; VERMA, I. M. Gene therapy: promises and problems. **Annual Review Genomics Human Genetics**, v. 2, p. 177-211, 2001.
- PFEIFER, A.; IKAWA, M.; DAYN, Y.; VERMA, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 99, p. 2140-2145, 2002.
- PFEIFER, A. Lentiviral transgenesis. **Transgenic Research**, v. 13, p. 513-522, 2004.
- POLLARD, V.; MALIM, M. The HIV-1 Rev protein. **Annual Review Microbiology**, v. 52, p. 491-532, 1998.
- POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; WELLS, K. D.; KERR, D. E.; PURSEL, V. G.; WALL, R. J. Cell Donor Influences Success of Producing Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 210-216, 2004.
- PRASHER, D. C. Using GFP to see the light. **Trends Genetics**, v. 11, p. 320-323, 1995.
- PRIVATO, M. B. **Mecanismos para indução da tolerância imunológica após transferência gênica no fígado do rato gunn**. 2005. 187f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Humana) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- PURSEL, V. G.; REXROAD, C.E. Status of research with transgenic farm animals. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 10-19, 1993.
- REICHENBACH, M.; LIM, T.; REICHENBACH, H. D.; GUENGOER, T.; HABERMANN, F. A.; MATTHIESEN, M.; HOFMANN, A.; WEBER, F.; ZERBE, H.; GRUPP, T.; SINOWATZ, F.; PFEIFER, A.; WOLF, E. Germ-line transmission of lentiviral PGK-EGFP integrants in transgenic cattle: new perspectives for experimental embryology. **Transgenic Research**, v. 19, p. 549-556, 2010.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.
- RITCHIE, W. A.; NEIL, C.; KING, T.; WHITELAW, C. B. Transgenic embryos and mice produced from low titre lentiviral vectors. **Transgenic Research**, v. 16, n.5, p.661-664, 2007.

- ROBL, J. M.; WANG, Z.; KASINATHAN, P.; KUROIWA, Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 67, p. 127-133, 2007.
- ROE, T.; REYNOLDS, T. C.; YU, G.; BROWN, P. O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. **Embo Journal**, v. 12, p. 2099-2108, 1993.
- ROH, S.; SHIM, H.; HWANG, W. S.; YOON, J. T. *In vitro* development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, p. 1-6, 2000.
- ROMANO, G.; MICHELL, P.; PACILIO, C.; GIORDANO, A. Latest development in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. **Stem Cells**, v. 18, n. 1, p. 19-39, 2000.
- RULICKE, T.; MONTAGUTELLI, X.; PINTADO, B.; THON, R.; HEDRICH, H. J. FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 301-311, 2007.
- RUMPF, R.; MELO, E. O. **Produção de Animais Transgênicos: metodologias e aplicações**. Documentos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, n. 145, p. 27, 2005.
- RUSMEVICHIENTONG, A.; CHOW, S. A. Biology and pathophysiology of the new human retrovirus XMRV and its association with human disease, **Immunologic Research**, v. 48, p. 27-39, 2010.
- RYBOUCHKIN A. KATO Y. TSUNODA Y. Role of Histone Acetylation in Reprogramming of Somatic Nuclei Following Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction** . 74, 1083–1089. 2006
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 ed., 2001.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SÁNCHEZ, O.; CARRATALÁ, Y. P.; PUERTA, S. G.; PEREIRA, N. C. P.; AMARÁN, L. S.; CHAVES, S. P. J.; TOLEDO, J. R. Dual promoter lentiviral vector generates transgenic mice expressing E2-CSFV glycoprotein in their milk, but impairs early identification of transgenic embryos. **Theriogenology**, v. 75, p. 1280-1289, 2011.
- SARMENTO, O. F.; DIGILIO, L. C.; WANG, Y.; PERLIN, J.; HERR, J. C.; ALLIS, C. D.; COONROD, S. A. Dynamic alterations of specific histone

- modifications during early murine development. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 4449-4459, 2004.
- SAWAI, K.; TAKAHASHI, M.; MORIYASU, S.; HIRAYAMA, H.; MINAMIHASHI, A.; HASHIZUME, T.; ONOE, S. Changes in the DNA Methylation Status of Bovine Embryos from the Blastocyst to Elongated Stage Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 1, 2010.
- SCHNEIDER, R.; CAMPBELL, M.; NASIOULAS, G.; FELBER, B. K.; PAVLAKIS, G. N. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of gag and Gag/protease and particle formation. **Journal of Virology**, v. 71, p. 4892-903, 1997.
- SHAW, G.; MORSE, S.; ARARAT, M.; GRAHAM, F. L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. **The FASEB Journal**, v 16, p. 869-871, 2002.
- SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: mechanisms and implications. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 459-467, 2007.
- SPENCER, T. E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v. 135, p. 165-179, 2008.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Savoy IL: IETS, 3.ed. 1998.
- TANG, D.; ZHU, H.; WU, J.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; CHEN, X.; DU, W.; WANG, D.; LIN, X. Silencing myostatin gene by RNAi in sheep embryos. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 69-74, 2012.
- TENÓRIO, L. Z.; SILVA, F. H.; HAN, S. W. A Potencialidade dos Lentivetores na Terapia Gênica. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 6, p. 260-267, 2008.
- TOLEDO, J. R.; PRIETO, Y.; ORAMAS, N.; SÁNCHEZ, O. Polyethylenimine-Based Transfection Method as a Simple and Effective Way to Produce Recombinant Lentiviral Vectors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.157, n. 3, p. 538-544, 2009.
- TRONO, D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. **Gene Therapy**, v. 7, p. 20-23, 2000.
- TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural Biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 1, p. 1-32, 1999.
- VAN DEN HAUTE, C.; EGGERMONT, K.; NUTTIN, B.; DEBYSER, Z.; BAEKELANDT, V. Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA

- results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain. **Human Gene Therapy**, v. 14, p. 1799-1807, 2003.
- VAN SOOM, A.; WRATHALL, A. E.; HERRLER, A.; NAUWYNCK, H. J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 21-31, 2010.
- VANCHA, A. R.; GOVINDARAJU, S.; PARSA, K. V. L.; JASTI, M.; GARCÍA, M. G.; BALLESTERO, R. P. Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 1-12, 2004.
- VIGNON X, LEBOURHIS D, CHESNE P, MARCHAL J, HEYMAN Y, RENARD JP. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstructed with quiescent and proliferative skin fibroblasts. **Theriogenology**, v. 51, p. 216, 1999.
- VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Biotecnologias da Reprodução Animal: clonagem e transgenia animal. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 11, supl. 1, p.139-144, abr. 2008.
- WAGNER, R.; GRAF, M.; BIELER, K.; WOLF, H.; GRUNWALD, T.; FOLEY, P.; UBERLA, K. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. **Human Gene Therapy**, v. 11, p. 2403-2413, 2000.
- WALL, R. J. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. **Theriogenology**, v. 45, p. 57-68, 1996.
- WALL, R. J. New gene transfer methods. **Theriogenology**, v. 57, p. 189-201, 2002.
- WANG, Y.; SONG, Y.; LIU, Q.; LIU, C.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHOU, X.; WU, J.; WEI, H. Quantitative analysis of lentiviral transgene expression in mice over seven generations. **Transgenic Research**, v. 19, p. 775-784, 2010.
- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. Scientific American Books, 2 nd ed., New York, 1992.
- Wells, K., Moore, K. & Wall, R. Transgene vectors go retro. **Nature Biotechnol.**, 17, 25–26. 1999
- WESTHUSIN, M. E.; LONG, C. R.; SHIN, T.; HILL, J. R.; LOONEY, C. R.; PRYOR, J. H.; PIEDRAHITA, J. H. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v. 55, p.35-49, 2001.

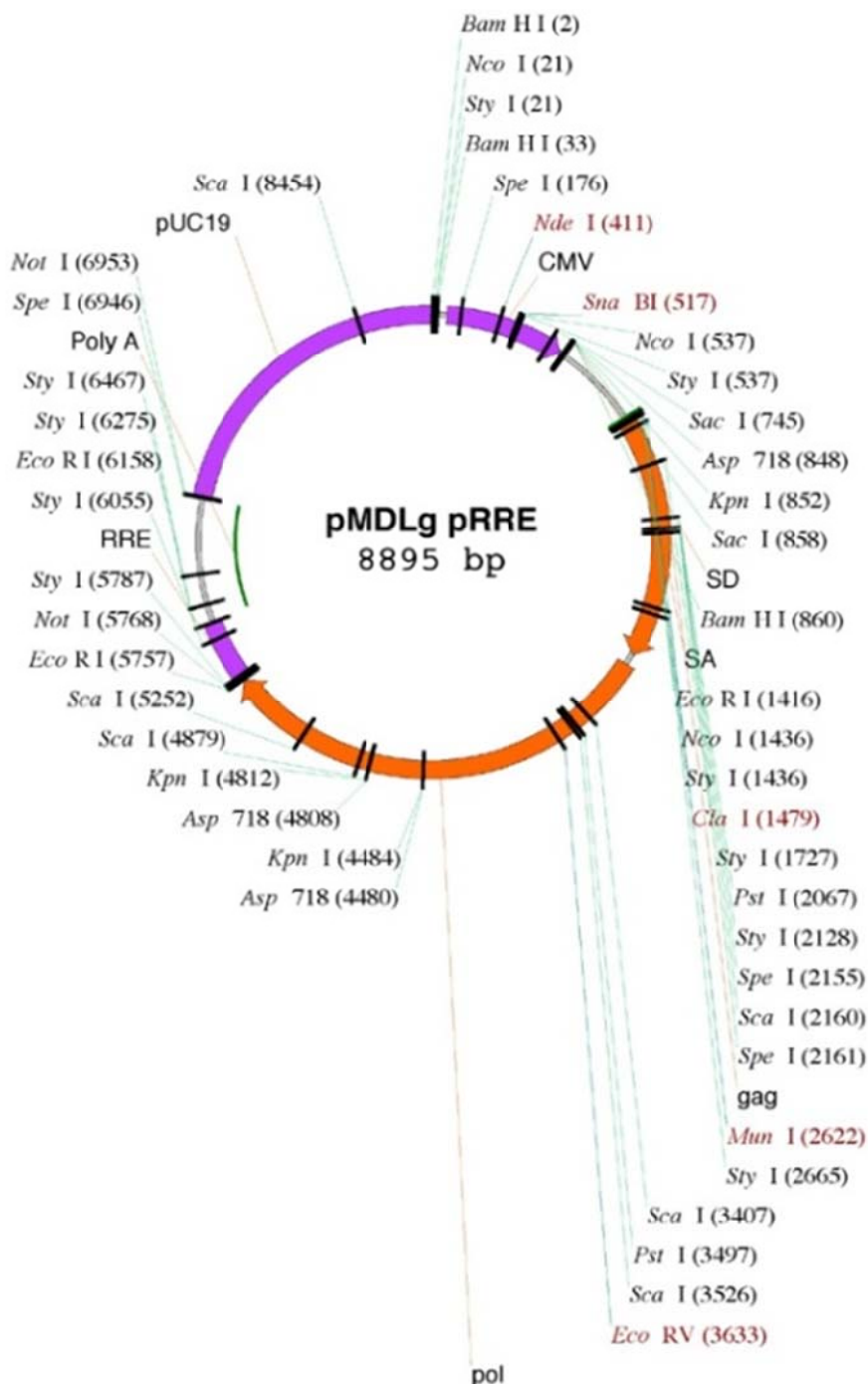
- WHEELER, M. B.; WALTERS, E. M.; CLARK, S. G. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 265-289, 2003.
- WHITELAW, C. B.; RADCLIFFE, P. A.; RITCHIE, W. A.; CARLISLE, A.; ELLARD, F. M.; PENA, R. N.; ROWE, J.; CLARK, A. J.; KING, T. J.; MITROPHANOUS, K. A. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. **FEBS Letters**, v. 571, n. 1-3, p. 233-236, 2004.
- WHEELER, M. B. Agricultural applications for transgenic livestock. **Trends in Biotechnology**, v.25, n.5, 2007.
- WHEELER, M.; SOBREIRA, L. A.; MALUSKY, A. S.; DAVIDSON, T.; FERGUSON, E.; MELLO, M. R. B. **Produção de Animais Transgênicos nas Espécies Domésticas**. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo, Roca, 2 ed., cap. 19, p. 365-393. 2008.
- WOLFGANG, M. J.; EISELE, S. G.; BROWNE, M. A.; SCHOTZKO, M. L.; GARTHWAITE, M. A.; DURNING, M.; RAMEZANI, A.; HAWLEY, R. G.; THOMSON, J. A.; GOLOS, T. G. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 98, p. 10728-10732, 2001.
- YEE, J.; MIYANOHARA, A.; LAPORTE, P.; BOUIC, K.; BURNS, J. C.; FRIEDMAN, T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 91, p. 9564-9568, 1994.
- YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, p. 153-154, 2001.
- ZAKHARTCHENKO V, MUELLER S, ALBERIO R, SCHERNTHANER W, STOJKOVIC M, WENIGERKIND H, WANKE R, LASSNIG C, MUELLER M, WOLF E, BREM G. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. **Mol Reprod Dev.**, v. 60, p. 362-369, 2001.
- ZHANG, Y. L.; WAN, Y. J.; WANG, Z. Y.; XU, D.; PANG, X. S.; MENG, L.; WANG, L. H.; ZHONG, B. S.; WANG, F. Production of dairy goat embryos, by nuclear transfer, transgenic for human acid b-glucosidase. **Theriogenology**, v. 73, p. 681-690, 2010.

ZUFFEREY, R.; DULL, T.; MANDEL, R. J.; BUKOVSKY, A.; QUIROZ, D.; NALDINI, L.; TRONO, D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. **Journal of Virology**, v. 72, p. 9873-9880, 1998.

## ANEXOS

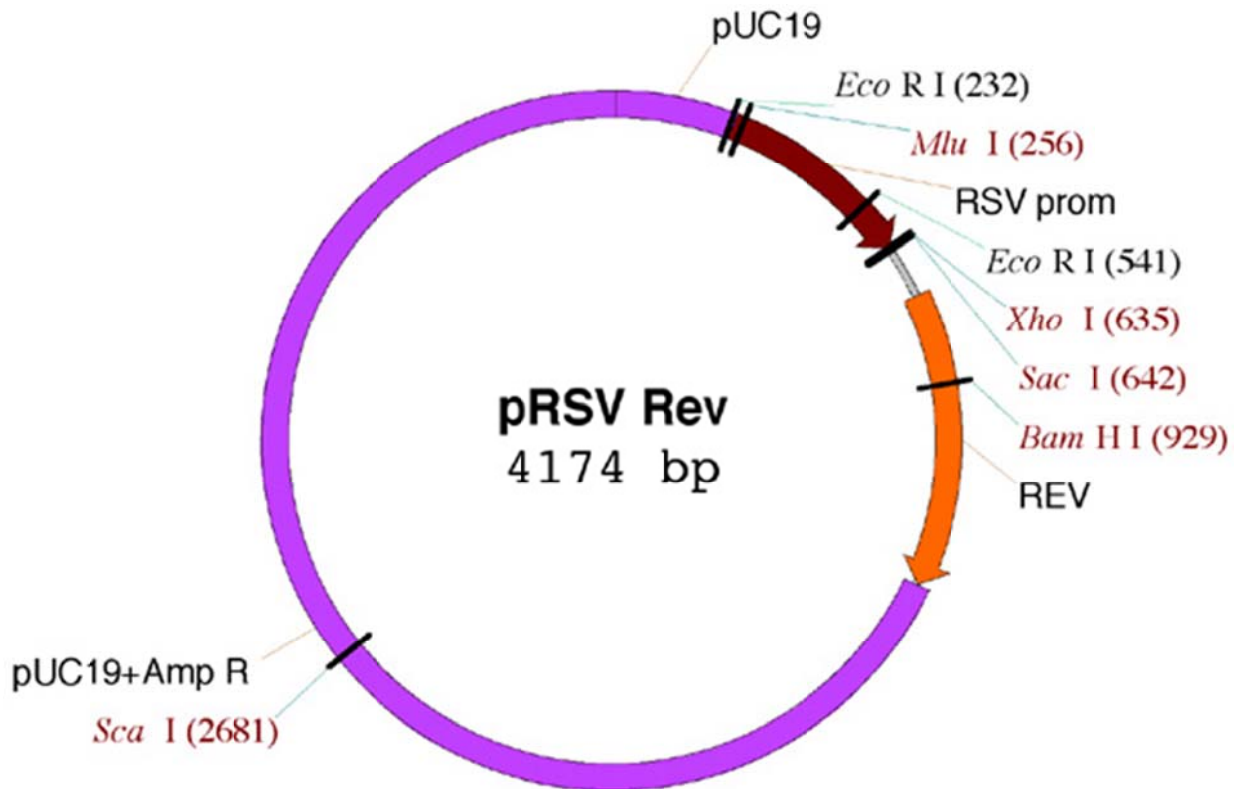
Mapas dos plasmídeos utilizados na montagem do vetor lentivirais.

### A. Mapa plasmídeo pMDLg/pRRE.



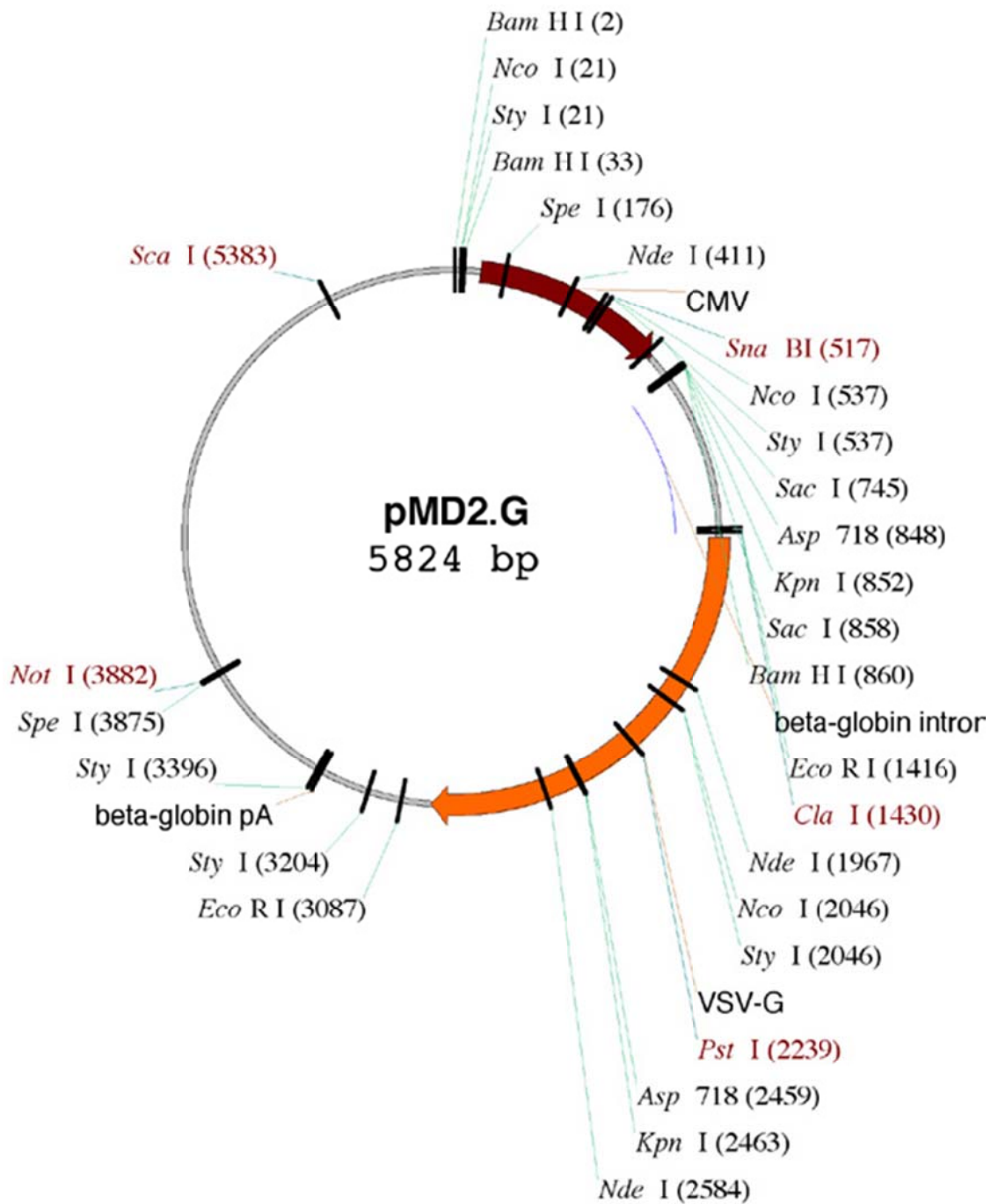
**pMDLg/pRRE** com os genes *gag* e *pol* que codificam proteínas que formam o capsídeo e enzimas essenciais para a replicação: *gag*, que codifica as principais proteínas estruturais, *pol*, responsável por codificar três proteínas específicas do retrovírus a transcriptase reversa, a integrase e a protease, e RRE, um sítio de ligação para a proteína Rev que facilita a exportação do RNA do núcleo. Este plasmídeo não inclui Rev. Tipo do vetor: empacotamento.

## B. Mapa plasmídico pRSV-Ver.



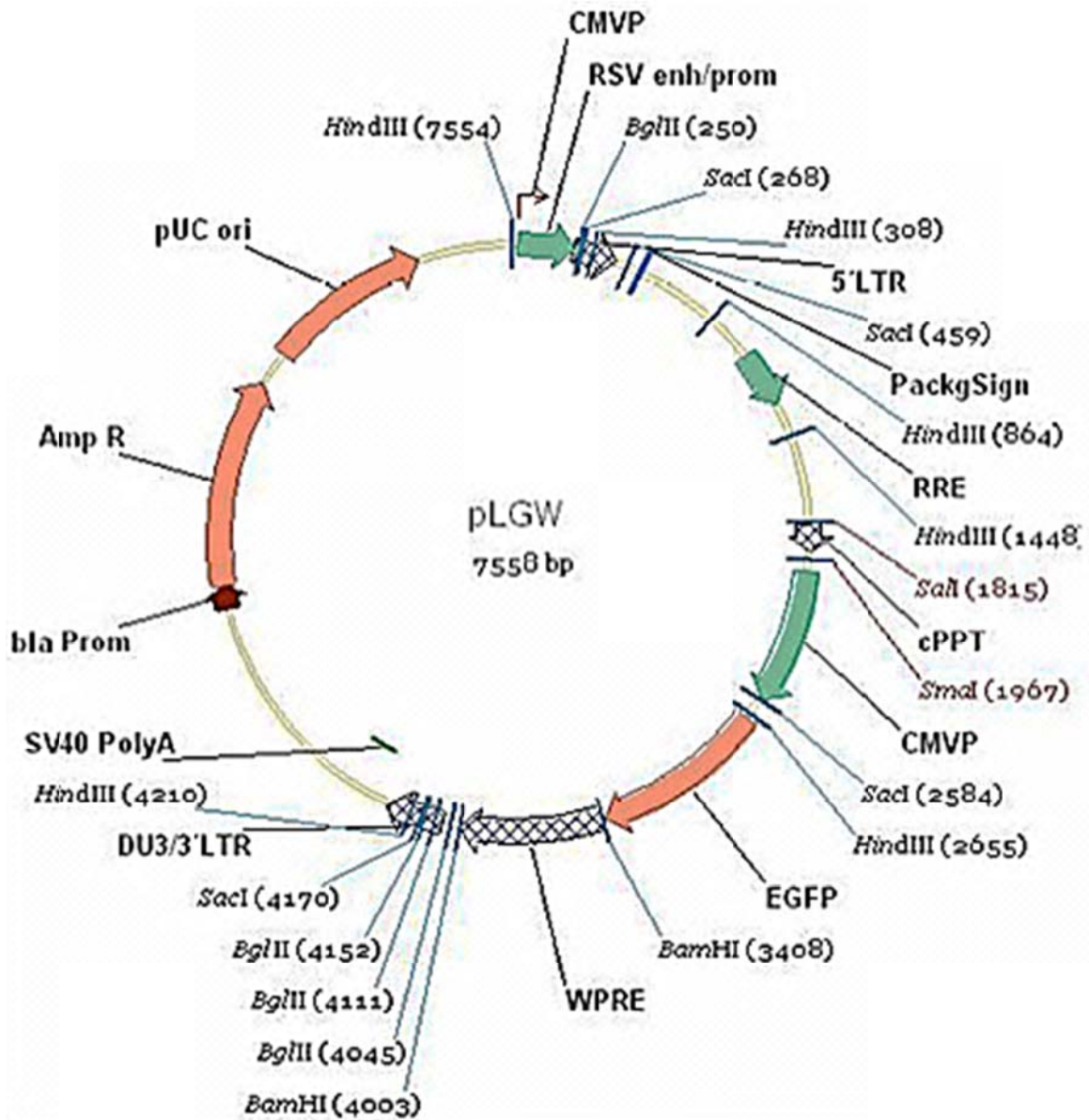
**pRSV-Rev.** com gene Rev que codifica a proteína Rev que permite a transcrição dos genes gag e pol do plasmídeo pMDLg/pRRE. Tipo do vetor: Empacotamento.

### C. Mapa do plasmídeo pMD2.



**pMD2.G** com o gene que codifica a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) presente na membrana do vetor viral que lhe permite interagir com receptores na célula-alvo. Tipo do vetor: Envelope.

## D. Mapa do plasmídeo pLGW.



**pLGW** com o gene que codifica a proteína fluorescente verde e as sequências de recombinação e montagem para armazenagem da molécula de transcrição GFP dentro do vetor viral.