



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Potencial de transfecção de células tronco mesenquimais bovinas

FERNANDA BORGES DUARTE

BRASÍLIA-DF

2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Potencial de transfecção de células tronco mesenquimais bovinas

Fernanda Borges Duarte

Trabalho de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Nair Bão

Co-orientador: Dr. Carlos Frederico Martins

BRASÍLIA-DF, 2018

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão que sempre me apoiaram e me deram o suporte necessário ao longo desses dois anos e meio de mestrado. Agradeço especialmente aos meus pais por todos os investimentos feitos na minha educação. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao meu querido professor, Ivo Pivato, do curso de Medicina Veterinária por ter acreditado no meu potencial e, por isso, ter me indicado para este projeto tão desafiador.

Agradeço ao pesquisador Carlos Frederico Martins (Fred) e à professora Sônia Bão por terem me acolhido neste projeto, por terem acreditado em mim, pela paciência com as dificuldades ao longo do desenvolvimento do trabalho, que não foram poucas, e pela orientação dada.

Agradeço à Universidade de Brasília e à EMBRAPA, que me receberam para a realização deste trabalho, bem como à FAP-DF, à FINEP, ao CNPq e à CAPES por financiarem o meu projeto de pesquisa.

Agradeço ao professor Marcelo Brígido que, apesar de não ser oficialmente um de meus orientadores, me auxiliou em diversos momentos ao longo de todo o experimento me ajudando a desenvolver e a compreender melhor este campo da biologia molecular que era completamente novo a mim. Bem como ao pesquisador Eduardo Melo que por vezes me orientou e ainda cedeu material para realização deste experimento.

Não posso deixar de agradecer a toda a equipe do professor Marcelo e da professora Andrea Maranhão que me recebeu tão bem em seu laboratório, sempre disposta a me ensinar, a me ajudar e, por muitas vezes, a escutar meus desabafos em

relação aos resultados que demoraram a dar certo. Gostaria de agradecer especialmente à Isabel Sousa, à Manuela Maragno, ao Ronny Petterson e ao Renato, que me auxiliaram ao longo de todo o experimento. Sem vocês esse experimento não teria acontecido.

Agradeço à Heidi que, sabendo da minha dificuldade de locomoção até a EMBRAPA CTZL, me auxiliou no início do cultivo celular e me orientou nos cuidados com as minhas células. Agradeço também ao Jhones por me ajudar com as primeiras imagens de microscopia de fluorescência, além de me manter informada sobre o computador que quebrou com as minhas imagens dentro (e até hoje não voltou!) e à Natalia que também me auxiliou pacientemente com as posteriores imagens de microscopia de fluorescência.

Agradeço aos meus amigos de longa data, Bia e Gui, que me apoiaram e me deram forças nos momentos de dúvidas e cansaço e sempre me incentivaram.

Por fim, não poderia deixar de agradecer ao Bruno pelo apoio, pelos conselhos, pela ajuda, pelo colo quando eu precisei, mas, acima de tudo, pela parceria ao longo deste semestre. Sem dúvidas a sua companhia tornou este período muito mais leve.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Anticorpo	14
1.2. Anticorpos monoclonais e seu uso na clínica	15
1.2.1. O mercado dos anticorpos monoclonais e as diferentes formas de produção	17
1.2.2. Anticorpo anti-CD3	20
1.3. Desenvolvimento experimental	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos gerais	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Local de realização deste trabalho	27
4.2. Isolamento e caracterização das células tronco	27
4.3. Construção do vetor plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO para expressão em glândula mamária	28
4.4. Obtenção do plasmídeo recombinante pBC1-anti-CD3-IRES-FEO em células de <i>Escherichia coli</i>	28
4.4.1. Produção e seleção de colônias celulares recombinantes	28
4.4.2. Obtenção do DNA plasmidial	29
4.4.3. Quantificação e verificação de perfil eletroforético do DNA plasmidial	30

4.4.4. Digestão do pBC1-anti-CD3-IRES-FEO para remoção do DNA bacteriano	30
4.5. Obtenção do plasmídeo recombinante pEF-NEO-GFP em células de <i>Escherichia coli</i>	31
4.6. Comparação do potencial de transfecção dos tipos celulares estudados utilizando os diferentes kits: lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ e Xfect™	31
4.6.1. Culturas celulares	31
4.6.2. Produção de células geneticamente modificadas	32
4.6.2.1. Preparo das células para os protocolos de transfecção celular	32
4.6.2.2. Protocolos de transfecção celular empregando os diferentes kits a serem testados	32
4.6.3. Análises pós-transfecção nos diferentes grupos celulares	33
4.6.3.1. Análise de expressão de GFP	33
4.6.3.2. Análise da mediana de fluorescência e da morfologia celular	33
4.6.3.3. Verificação da presença do pBC1-anti-CD3-IRES-FEO nas células transformadas por reação em cadeia de polimerase (PCR)	34
4.6.3.3.1. Preparo das células transformadas e selecionadas para análise por PCR	35
4.6.3.3.2. Análise das amostras	36
4.7. Análise estatística	34
5. RESULTADOS	37

5.1. Obtenção dos DNA de interesse em células e <i>Escherichia coli</i>	37
5.2. Remoção do DNA de origem bacteriana do plasmídeo pBC1-anti-CD3-IRES-FEO	37
5.3. Cultivo celular	38
5.4. Transfecção celular	39
5.5. Análises pós-transfecção	39
5.5.1. Microscopia de fluorescência	39
5.5.2. Análise em citometria de fluxo	42
5.5.3. Análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	49
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	59
8. PERSPECTIVAS	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de uma molécula de anticorpo IgG secretada (Adaptado de Abbas et al., 2008)	14
Figura 2: Mapa do plasmídeo pBC1-anti-CD3-IRES-FEO	23
Figura 3: Perfil eletroforético de digestão do DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO com as enzimas de restrição <i>Not I</i> e/ou <i>Sal I</i>	36
Figura 4: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas do tecido adiposo após 24 h da transfecção celular	40
Figura 5: Microscopia de fluorescência dos fibroblastos após 24 h da transfecção celular	41
Figura 6: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas da geleia de Wharton após 24 h da transfecção celular	42
Figura 7: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas do tecido adiposo após 48 h da transfecção celular	43
Figura 8: Microscopia de fluorescência dos fibroblastos após 48 h da transfecção celular	44
Figura 9: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas da geleia de Wharton após 48 h da transfecção celular	45
Figura 10: Gráfico de pontos e gráfico da mediana de fluorescência (MF) referentes à análise por citometria de fluxo dos diferentes tratamentos para as células mesenquimais isoladas do tecido adiposo	47
Figura 11: Gráfico de pontos e gráfico da mediana de fluorescência (MF) referentes à análise por citometria de fluxo dos diferentes tratamentos para os fibroblastos	48
Figura 12: Perfil eletroforético do DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO proveniente da maxiprep (Controle positivo) após realização da análise por reação em cadeia da polimerase	50
Figura 13: Perfil eletroforético da análise por PCR realizada com as amostras de material genômico extraídas dos fibroblastos após duas semanas em cultivo sob pressão seletiva com geneticina	50
Figura 14: Perfil eletroforético da análise por PCR realizada com as amostras de material genômico extraídas das células mesenquimais isoladas do tecido adiposo após duas semanas em cultivo sob pressão seletiva com geneticina	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes isótipos de imunoglobulinas e suas funções (Adaptada de Abbas et al., 2008)	14
Tabela 2. Sequência e anelamento de ambos os iniciadores e tamanho do amplicon resultante da reação em cadeia de polimerase	35
Tabela 3. Mediana de fluorescência para os diferentes tratamentos de transfecção em células mesenquimais isoladas do tecido adiposo e fibroblastos bovinos	49

RESUMO

Células de diferentes origens comportam-se de maneira distinta quanto à incorporação de um material genético exógeno e formação de uma célula transgênica. Tendo isto em vista, diferentes protocolos de transfecção foram testados e comparados para células mesenquimais de duas origens distintas: da geleia de Wharton (CMGW), do tecido adiposo (CMADP) e fibroblastos (FIB). O anti-CD3 humanizado é um anticorpo monoclonal que interage com a molécula CD3 do receptor da célula T levando à supressão das células T, tendo em vista que esta região é responsável pela ativação destas células. Por este motivo, este anticorpo é considerado uma opção no tratamento de doenças autoimunes e pós transplantes de órgãos. Sabendo do seu potencial para a saúde pública e pensando em formas de otimizar a produção do anti-CD3 humanizado ele foi utilizado neste trabalho para a produção de células transgênicas que, no futuro, poderão ser utilizadas na elaboração de animais biorreatores produtores desta proteína recombinante por meio de transferência nuclear. Neste projeto, a técnica de transfecção foi aplicada utilizando os kits de transfecção: lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ e Xfect™. Após o tratamento, as células foram submetidas a análises de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e reação em cadeia de polimerase (PCR). As células mesenquimais da geleia de Wharton mostraram-se sensíveis aos tratamentos e entraram no estágio de morte celular. Na citometria de fluxo, a mediana da fluorescência foi superior para as CMADP em relação aos FIB, tanto para o reagente XFECT ($20.057 \pm 1.620,7$ e $10.601 \pm 702,86$, respectivamente. $p < 0,05$) quanto para o LTX ($19.590 \pm 113,84$ e $10.518 \pm 442,65$ respectivamente. $p < 0,05$). Estes resultados, associados à avaliação de epifluorescência, demonstraram que as

CMADP apresentam uma melhor resposta à transfecção quando comparadas aos FIB, independente do kit utilizado. Além disso, a PCR realizada com as células mesenquimais do tecido adiposo e com os fibroblastos co-transfectados comprovou a presença do DNA de interesse em todas as amostras, viabilizando esta abordagem em experimentos futuros.

Palavras-chave: Transfecção, pBC1, anti-CD3 humanizado, anticorpo monoclonal.

ABSTRACT

Cells from different origins behave differently regarding the incorporation of an exogenous genetic material and the formation of a transgenic cell. Taking that into consideration, different transfection protocols were tested and compared to mesenchymal cells of two distinct origins: Wharton's jelly (CMGW), adipose tissue (CMADP) and fibroblasts (FIB). Humanized anti-CD3 is a monoclonal antibody that reacts with the CD3 molecule of the T cell receptor leading to suppression of the T cells, since this region is responsible for the activation these cells. For this reason, this antibody is considered as an option in the treatment of autoimmune diseases and after organ transplants to avoid rejection. Knowing the potential of this monoclonal antibody for public health and thinking of ways to optimize the production of the humanized anti-CD3, it was used in this experiment to produce transgenic cells that, in the future, could be used in the production of transgenic animal bioreactors, which expresses this recombinant protein, by nuclear transfer. In this study, the transfection technique was applied using the transfection kits: lipofectamine® LTX with PLUS™ reagent and Xfect™. After the treatment the cells were submitted to fluorescence microscopy, flow cytometry and polymerase chain reaction (PCR) analyzes. Wharton's jelly mesenchymal cells were sensitive to the treatments and entered in the cell death stage. In the flow cytometry, the fluorescence median was higher for the CMADP in relation to the FIB, for both Xfect reagent ($20,057 \pm 1,620.7$ and $10,601 \pm 702.86$, respectively, $p < 0.05$) and for the LTX ($19,590 \pm 113.84$ and $10,518 \pm 442.65$ respectively, $p < 0.05$). These results, associated with the evaluation of epifluorescence, demonstrated that the CMADP present a better response to transfection when compared to the FIB, regardless of the kit used. In addition, the PCR performed with co-transfected

mesenchymal cells of the adipose tissue and fibroblasts confirmed the presence of the DNA of interest in all samples, making this approach feasible in future experiments.

Keywords: Transfection, pBC1, humanized anti-CD3, monoclonal antibody

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anticorpo

Os anticorpos (Ac), moléculas produzidas pelos linfócitos B, são parte fundamental do sistema imunológico. Eles estão envolvidos na resposta imune humoral e agem reconhecendo os antígenos extracelulares. Dependendo do tipo de estímulo e do Ac resultante, o mecanismo de ação pode variar, mas as suas funções básicas são de neutralizar ou marcar os corpos estranhos a fim de eliminá-los, seja pela ativação do sistema complemento, seja pela ativação de células envolvidas no sistema imune que apresentem função fagocitária (Abbas et al., 2008).

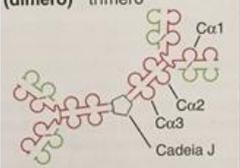
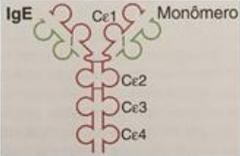
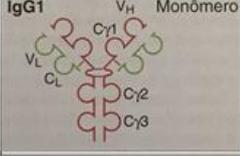
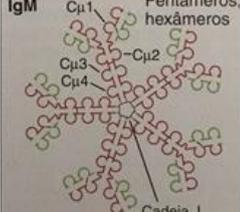
A estrutura básica de um anticorpo (**Fig. 1**), ou imunoglobulina (Ig) como também pode ser denominado, é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves idênticas. Ambas possuem uma região variável, com função de reconhecimento do antígeno, e uma região constante, mas apenas na cadeia pesada esta fica responsável por interagir com outras estruturas do sistema imune ou por ancorar a Ig à membrana plasmática dos linfócitos B (Janeway et al., 2001; Abbas et al., 2008).



Figura 1: Esquema de uma molécula de anticorpo IgG secretada (Adaptado de Abbas et al., 2008). V_H – Domínio variável da cadeia pesada; V_L – Domínio variável da cadeia leve. C_H^{1-3} – Domínio constante da cadeia pesada C_L – Domínio constante da cadeia leve; Fc – *Fragment, Crystallizable*; Fab – *Fragment, antigen binding*.

As imunoglobulinas secretadas podem ser classificadas, de modo geral, em IgA, IgE, IgG e IgM. O que diferencia umas das outras é a região constante da cadeia pesada, tanto na composição quanto no tamanho da estrutura. Tendo em vista que esta região é responsável pela interação do anticorpo com o restante do sistema imune, cada Ig vai apresentar uma função efetora diferente (**Tabela 1**).

Tabela 1: Diferentes isótipos de imunoglobulinas e suas funções (Adaptada de Abbas et al., 2008)

Imunoglobulinas	Funções
<p>IgA (dímero) Monômero, dímero, trimero</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Imunidade das mucosas; - Ativação do sistema complemento.
<p>IgE Monômero</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Reação de hipersensibilidade imediata.
<p>IgG1 Monômero</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Opsonização de antígenos; - Ativação do sistema complemento; - Imunidade neonatal; - Inibição por <i>feedback</i> da ativação dos linfócitos B.
<p>IgM Pentâmeros, hexâmeros</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação da via clássica do sistema complemento; - Receptor a antígenos dos linfócitos B naíves.

1.2. Anticorpos monoclonais e seu uso na clínica

A resposta imune humoral é naturalmente policlonal, pois, quando um corpo estranho ao hospedeiro é identificado pelos linfócitos B, estes são ativados produzindo Ac específicos para o antígeno ao qual ele reconheceu. No entanto, diferentes linfócitos B se ligam a diferentes epítomos de um antígeno, gerando anticorpos com especificidades diferentes (Abbas et al., 2008).

Embora os anticorpos policlonais (pAc) extraídos do soro de animais imunizados tenham aplicações clínicas, já foi demonstrado que apenas um pequeno número dos Ac presentes apresentará a especificidade desejada podendo levar a uma baixa eficiência no tratamento. Já os demais Ac presentes podem levar ao surgimento de efeitos colaterais no paciente que receber o medicamento. Além disso, há uma dificuldade de replicação dos resultados em uma segunda aplicação, tendo em vista que a composição do soro pode mudar de uma produção para outra (Nilson et al., 2005; Ferrara et al., 2015; Chaisri e Chaicumpa, 2018).

Em 1975, Köhler e Milstein desenvolveram a técnica de hibridação, que consiste na junção de células do mieloma com esplenócitos de ratos, previamente imunizados para um antígeno de interesse, produzindo uma linhagem de células híbridas imortalizadas produtoras de anticorpos. Por serem originados de um único clone os Ac resultantes são denominados de anticorpos monoclonais (mAc) e apresentam especificidade para uma única região do antígeno. Pelo desenvolvimento desta importante técnica, ambos receberam o prêmio Nobel de medicina em 1984.

Com o advento desta técnica foi possível desenvolver diversos fármacos como o OKT3 (Kung et al., 1979), também conhecido como muromonab-CD3, o primeiro anticorpo monoclonal a ser liberado pelo órgão regulador dos Estados Unidos – FDA (*Food and Drug Administration*) – em 1986. Por este ser de origem murina os pacientes acabavam desenvolvendo anticorpos humanos anti-murinos (HAMA – do inglês *human anti-murine antibodies*) que, por sua vez, formavam complexos com os mAc de origem murina levando a uma diminuição ou até a uma eliminação dos efeitos do tratamento (Hosono et al., 1992; Sgro, 1995). Por esta e outras razões, melhor exploradas no tópico ‘1.2.2.’, este medicamento foi descontinuado.

Procurando solucionar os problemas relacionados à resposta HAMA, anticorpos quiméricos foram produzidos por meio da engenharia genética em que a região variável ou toda a região Fab do Ac permanece sendo de origem murina e toda a região constante ou a região Fc passa a ser de origem humana, diminuindo a sua imunogenicidade e aumentando a sua meia-vida (Morrison et al., 1984; LoBuglio et al., 1989).

Em busca de diminuir ainda mais a resposta imune contra estes fármacos, os anticorpos monoclonais humanizados foram produzidos. Estes apresentam a região constante do Ac humano, já a fração variável é desenhada para assemelhar-se ao máximo com a humana, porém as regiões determinantes de complementariedade (CDR – do inglês *complementarity determining regions*) de origem murina, responsáveis por reconhecer e se ligar ao antígeno, são mantidas (Maranhão e Brígido, 2001).

Já é possível inclusive produzir anticorpos monoclonais completamente humanos utilizando estratégia semelhante a técnica de hibridação ou até por meio de ratos transgênicos, cujos linfócitos B expressam anticorpos humanos (Brüggemann et al., 2015).

Desde a aprovação do primeiro mAc na clínica, diversos outros fármacos foram produzidos e regulamentados como o Rituximab em 1997 (Scott, 1998), o Pertuzumab em 2012 (Amri-Kordestani, 2014), o Atezolizumab em 2016, e as drogas que foram posteriormente desenvolvidas para o mesmo fim clínico, Durvalumab, Nivolumab, Avelumab e Pembrolizumab (Hsu et al., 2017), comprovando a relevância desta tecnologia na terapêutica e a importância de estudos realizados a fim de produzir novos medicamentos cada vez mais específicos e mais eficientes.

1.2.1. O mercado dos anticorpos monoclonais e as diferentes formas de produção

Entre os anos de 1986 e 2014 um total de 58 fármacos provenientes de mAc, dos diversos tipos, foram aprovados na Europa e/ou nos Estados Unidos, destes, 11 foram descontinuados, por diferentes motivos, permanecendo 47 em uso clínico. Em 2010, o comércio dos anticorpos monoclonais terapêuticos apresentou um rendimento de US\$ 42,4 bilhões e, em apenas 3 anos, esse valor subiu para aproximadamente US\$ 75 bi, o que representa um aumento de quase 77%, com previsões de atingir o patamar de US\$ 125 bi até 2020 (Yagami et al., 2013; Ecker et al., 2015).

Em 2013, o anticorpo monoclonal humano Humira® apresentou sozinho vendas de aproximadamente US\$ 11 bi, sendo este o maior valor registrado para um biofármaco até então, e outros cinco medicamentos (Remicade®, Enbrel®, Rituxan®, Avastin® e Herceptin®) apresentaram vendas superiores a US\$ 6 bi (Ecker et al., 2015).

A crescente demanda por estes fármacos leva a uma constante busca por estratégias cada vez mais eficientes de produção. A hibridação, que consiste na junção de células produtoras de anticorpos com células cancerígenas, foi a primeira tecnologia desenvolvida para este fim. Esta técnica pode ser associada a uma tecnologia desenvolvida posteriormente: ratos transgênicos produtores de imunoglobulinas humanas. Neste caso, os linfócitos B destes animais são utilizados para a formação dos hibridomas gerando mAc humanos (Yagami et al., 2013; Chaisri e Chaicumpa, 2018).

Outras metodologias utilizadas para este fim são o *phage* e o *yeast display* em que, geralmente, fragmentos de anticorpos são produzidos e expressos na superfície de fagos e leveduras, respectivamente. Os fagos apresentam uma produção mais elevada quando comparados às leveduras, no entanto, o controle dos parâmetros de seleção é mais eficiente nas leveduras (Sheehan e Marasco, 2015).

Células de mamíferos vêm sendo muito utilizadas para a produção de anticorpos monoclonais, de forma que a grande maioria dos mAc terapêuticos são produzidos por meio desta tecnologia. Este processo comumente envolve o crescimento de células hospedeiras (as mais comuns são a NS0, a CHO e a PER.C6, oriundas de mieloma murino, ovário de hamster chinês e células da retina embrionária, respectivamente), escolha do vetor de expressão e clonagem molecular com o plasmídeo referente ao mAc de interesse, transfecção celular e identificação do bioproduto no meio de cultivo (Li et al., 2010).

Esta técnica pode ser laboriosa e onerosa tendo em vista a dificuldade de se otimizar os processos de produção levando em consideração o tipo celular a ser utilizado, o complexo meio de cultivo e as demandas específicas a cada caso, além das taxas de produção de mAc (Suscovich e Alter, 2015).

Por fim, o desenvolvimento de animais transgênicos biorreatores tornou-se possível com os avanços no campo da engenharia genética. Estes animais têm o seu DNA alterado para produzir bioprodutos em uma ou mais de suas secreções como: leite, saliva, sangue, urina, sêmen ou clara do ovo, por exemplo (Wang et al., 2000).

Diversos animais transgênicos já foram produzidos para este fim, desde animais de laboratório como ratos (Quian et al., 2014; Wu et al., 2014) e coelhos (Lipinski et al., 2012), quanto animais de grande porte como suínos (Lee et al., 2014), caprinos (Freitas et al., 2007), bovinos (Wu et al., 2012) e bubalinos (Lu et al., 2018).

Esta técnica vem sendo considerada promissora por permitir uma produção em larga escala de proteínas recombinantes de interesse, além de apresentar um custo inferior quando comparado às demais formas de produção (Wang et al., 2000), características atrativas por irem ao encontro das necessidades do mercado.

1.2.2. Anticorpo Anti-CD3

O anticorpo monoclonal OKT3 foi produzido por Kung e colaboradores em 1979. Eles demonstraram neste trabalho a interação desta molécula com a superfície de células T periféricas.

Hoje já se sabe que esta reação ocorre mais especificamente com a molécula CD3, um dos componentes invariáveis do receptor da célula T (TCR – do inglês *T cell receptor*), que, por sua vez, tem como função ativar as células T efetoras ao reconhecer os peptídeos dos antígenos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Abbas et al., 2008).

A reação com este importante componente do complexo TCR em células T maduras leva inicialmente a uma hiperestimulação destas células, com posterior inibição do processo de lise celular. O segundo processo acaba gerando uma supressão das células T enquanto o medicamento estiver sendo utilizado e, por esta característica, a droga passou a ser considerada como um possível tratamento em indivíduos que precisam suprimir o sistema imune como, por exemplo, em pacientes recém-transplantados (Chang et al., 1981; Landegren et al., 1982; Abbas et al., 2008).

Em 1986, o uso deste anticorpo foi autorizado nos Estados Unidos pela FDA no tratamento à rejeição de transplantes de órgãos sólidos (Kuhn e Weiner, 2016). Ao longo do seu tempo de uso, porém, foram observados alguns efeitos adversos relacionados à primeira dose do medicamento, em decorrência da ativação das células T com a consequente liberação de citocinas inflamatórias, como: dores de cabeça, náuseas, vômito, febre, podendo provocar também, em casos extremos, trombose, insuficiência renal, desordens cardiorrespiratórias ou, mais raramente, encefalopatias (Sgro, 1995).

Outro efeito adverso comum é a produção de anticorpos contra o próprio OKT3, por este ser de origem murina, impedindo o uso prolongado desta droga e inviabilizando tratamentos a longo prazo (Chatenoud et al., 1986; Kimball et al., 1995). Por estes motivos o OKT3 foi descontinuado e desde então não foi autorizada a utilização de outro anticorpo monoclonal anti-CD3 na clínica médica.

Devido a sua especificidade de reação com as células T maduras e seu poder de modulação imunogênica, o uso do anti-CD3 é considerado como promissor no tratamento de diversas doenças e condições clínicas que envolvem processos autoimunes. Tendo isso em vista, novos estudos surgiram na tentativa de humanizar este anticorpo a fim de diminuir ou eliminar os efeitos adversos tornando a droga mais segura, além de permitir tratamentos a longo prazo (Routledge et al., 1991; Bolt et al., 1993; Herold et al., 2002; Silva et al., 2009).

Desde o desenvolvimento do OKT3 até hoje, com o processo de humanização do anti-CD3, essa droga já foi testada, sozinha ou em associação com outras drogas, no tratamento de diversos quadros clínicos como: rejeição ao transplante de órgãos sólidos (Fung et al., 1987; Gordon et al., 1988; Fung & Starzl, 1991; Hooks, Wade e Millikan, 1991), diabetes tipo 1 (Chatenoud et al., 1994; Begum et al., 2009), hepatite autoimune (Marceau et al., 2014) e câncer de próstata resistente à castração (Vaishampayan et al., 2015), geralmente apresentado bons resultados, provando a relevância da produção deste anticorpo para a saúde pública, sendo escolhido para testes neste trabalho de mestrado.

1.3. Desenvolvimento experimental

Tendo em vista o potencial da técnica de geração de animais transgênicos biorreatores para a produção de biofármacos, este estudo procurou comparar protocolos

de transfecção para produção de células tronco mesenquimais bovinas geneticamente modificadas a fim de, no futuro, utilizar a melhor estratégia na geração de um animal biorreator.

Nestes casos, a glândula mamária é considerada a melhor opção para a produção de bioprodutos, pois tem uma alta capacidade de produção diária, além de proporcionar uma fácil coleta (Wang et al., 2000).

Pensando nisso, o vetor escolhido foi o pBC1 (Invitrogen®). Trata-se de um vetor comercial que visa promover a expressão de proteínas recombinantes no leite de fêmeas transgênicas. As sequências gênicas referentes ao promotor de β -caseína e ao DNA genômico da β -caseína de cabras estão presentes, desta forma, o DNA de interesse é expresso basicamente na glândula mamária no período de lactação (Invitrogen, 2010).

Além disso, o vetor pBC1 apresenta uma sequência de íntrons e éxons da própria β -caseína, tendo como finalidade o aumento na taxa de expressão deste DNA, bem como, o gene do insulador de β -globulina, responsável por proteger o promotor de β -caseína de possíveis estruturas regulatórias que estejam próximas, promovendo a sua expressão, independente do local de inserção do DNA plasmidial ao DNA genômico (Invitrogen, 2010).

Este plasmídeo também possui sequências gênicas importantes na etapa de clonagem molecular como o gene *bla*, que confere resistência à ampicilina, e a origem de replicação (*ori*) do plasmídeo pBR322, utilizada pela bactéria para produzir múltiplas cópias deste DNA (Invitrogen, 2010). Todas essas sequências gênicas, no entanto, aumentam muito o tamanho do plasmídeo, que, sem o inserto de interesse, apresenta 21,6 kb.

Por ter sido desenhado para técnica de microinjeção pronuclear, este DNA não possui uma sequência gênica que permita a seleção das células geneticamente

modificadas ao utilizá-lo na técnica de transfecção de células de mamíferos como, por exemplo, resistência a antibiótico adequado ou fluorescência que permita a distinção entre células transfectadas e não-transfectadas. Este problema pode ser resolvido adicionando a marca de seleção ao DNA de interesse ou realizando uma co-transfecção com um segundo DNA que possua as marcas de seleção adequadas para células de mamíferos.

Pensando em experimentos *in vitro* futuros, a sequência IRES-FEO, que apresenta tanto a proteína fluorescente verde (GFP) quanto a resistência aos antibióticos da família da neomicina, foi acrescida ao gene do anticorpo anti-CD3 humanizado. No entanto, este DNA só será expresso em células de glândula mamária, não servindo como método de seleção neste trabalho (**Fig. 2**). O DNA pEF-NEO-GFP (6.097 pb), que apresenta os mesmos meios de seleção, foi utilizado para a co-transfecção.

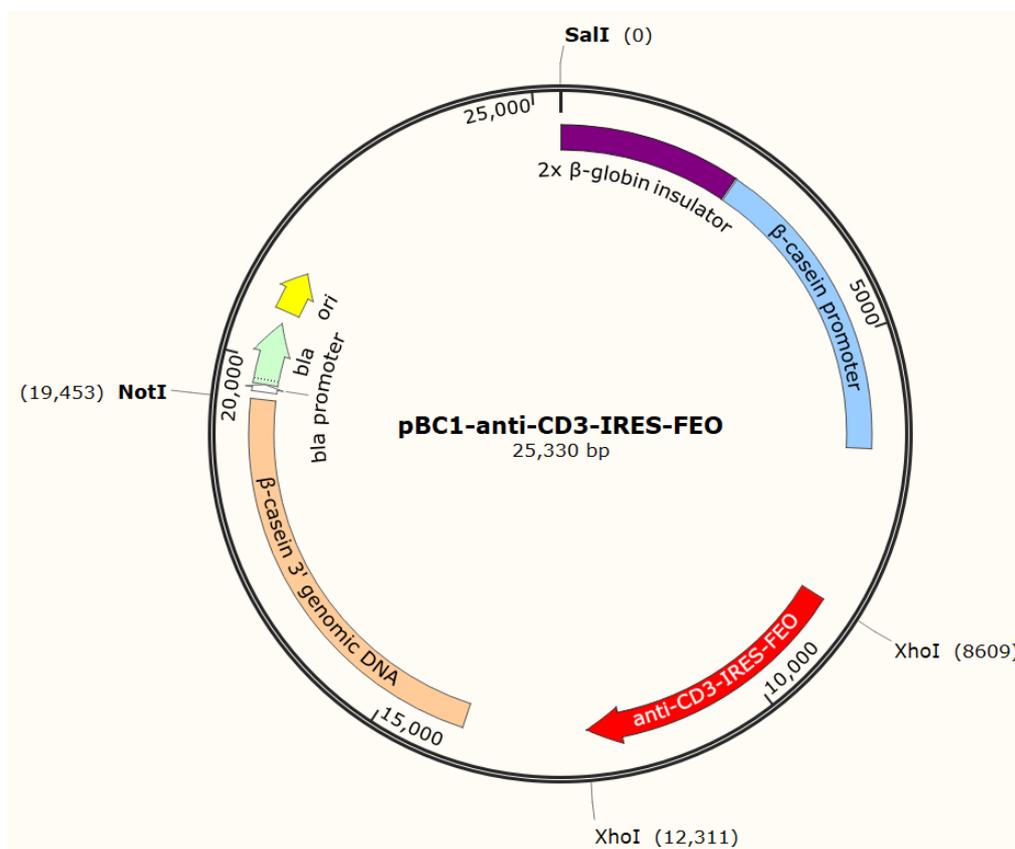


Figura 2: Mapa do plasmídeo pBC1-anti-CD3-IRES-FEO.

Dois kits foram escolhidos para os testes de transfecção: lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ (Thermo Scientific™) e Xfect™ (Clontech). O primeiro é um lipossoma catiônico acrescido de um coquetel de peptídeo que tem a finalidade de potencializar a reação de transfecção. Já o segundo é um polímero catiônico biodegradável de baixa citotoxicidade.

Por fim, as células foram selecionadas baseadas em estudos anteriores em que Silva e colaboradores (2016a, 2016b) isolaram e caracterizaram células tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo e da geleia de Wharton, substância gelatinosa presente no cordão umbilical, posteriormente demonstrado o potencial destas células como doadoras de núcleo na técnica de transferência nuclear. Além disso, as células mesenquimais têm como característica a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares, bem como, costumam apresentar uma facilidade de cultivo *in vitro*, que serviram como atrativos na sua escolha para este trabalho (Sharma et al., 2014).

Já os fibroblastos foram selecionados por serem muito utilizados na clonagem animal tendo como vantagem a sua facilidade de coleta e cultivo *in vitro*, apresentando protocolos bem definidos, além de já terem sido empregados na produção de animais transgênicos (Melo et al., 2005; Meng et al., 2013; Lu et al, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Células de diferentes origens comportam-se de maneira distinta quanto à incorporação de um material genético exógeno e obtenção de uma célula transgênica. Tendo isto em vista, fibroblastos e células tronco mesenquimais bovinas isoladas do tecido adiposo e da geleia de Wharton foram submetidas a mais de um protocolo de transfecção.

Baseado em estudos anteriores, verificou-se que o lipossoma lipofectamine® é bastante efetivo na transfecção de fibroblastos bovinos. Sugere-se que a adição de um coquetel de peptídeos disponível comercialmente reforce a ligação DNA/lipossoma. O polímero catiônico de baixa toxicidade celular, Xfect™ (Clontec), também foi testado com fins comparativos.

O anticorpo monoclonal anti-CD3 humanizado apresenta-se como uma possibilidade no tratamento de doenças autoimunes e em pacientes transplantados a fim de evitar rejeição ao órgão, sendo de relevância à saúde pública.

O desenvolvimento de um protocolo eficiente para a produção de células transgênicas para este gene auxilia em pesquisas futuras nas quais estas poderão servir como células doadoras de núcleo na técnica de transferência nuclear, por exemplo. Esta técnica é considerada como uma opção para a produção de animais biorreatores para proteínas recombinantes de interesse, o que potencializaria a produção deste anticorpo em larga escala.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Verificar e comparar o potencial de transfecção dos fibroblastos (FIB) e das células mesenquimais bovinas de duas diferentes origens: geleia de Wharton (CMGW) e tecido adiposo (CMADP), além de estabelecer o melhor protocolo de transfecção dentre os dois métodos testados.

3.2. Objetivos específicos

- Construção do vetor de expressão pBC1 contendo o gene anti-CD3 humanizado acrescido da sequência gênica IRES-FEO para expressão heteróloga em células da glândula mamária;
- Testar a eficiência da lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ (Thermo Scientific™) e do polímero catiônico Xfect™ (Clontech) na transfecção das células testadas;
- Comparar a resposta dos fibroblastos e das células mesenquimais de duas diferentes origens (geleia de Wharton e tecido adiposo) à transfecção;
- Avaliar a co-transfecção como alternativa para integração estável do DNA exógeno e posterior seleção e estabelecimento da linhagem celular transgênica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização deste trabalho

O isolamento e caracterização celular foram realizados no Centro de Tecnologias para Raças Zebuínas Leiteiras (CTZL) da Embrapa Cerrados, supervisionado pelo pesquisador Carlos Frederico Martins. Já os estudos para construção do vetor, cultivo e transfecção celular e comprovação da integração do DNA exógeno foram realizados no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) sob supervisão do professor Marcelo Brígido.

4.2. Isolamento e caracterização das células tronco

As células tronco mesenquimais da geleia de Wharton, do tecido adiposo e fibroblastos de pele foram isolados de animais da raça Gir Leiteiro provenientes do CTZL e caracterizadas em outros trabalhos desta equipe, conforme metodologia descrita por Silva e colaboradores, (2016a; 2016b; 2018 no prelo). Nestes estudos, as células mesenquimais da geleia de Wharton e do tecido adiposo foram caracterizadas para a presença de marcadores celulares (fenotipagem), pluripotência e quanto à habilidade de diferenciação em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas. A fenotipagem foi realizada usando citometria de fluxo. As células foram incubadas com os anticorpos primários CD29 (anti-integrin β 1), CD34 (*hematopoietic precursor cells* e MSCs); CD45 (*anti-bone marrow lymphoid cells*); CD73 (anti-nucleotidase), CD90 (anti-THy1 antigen); CD105 (anti-endoglin) (Sigma-Aldrich®), considerados importantes para caracterizar a origem mesenquimal das células tronco. As células caracterizadas como tronco mesenquimais e fibroblastos, que não passaram pelo mesmo procedimento de caracterização, dos mesmos animais estavam armazenadas em nitrogênio líquido, sendo

descongeladas e, posteriormente, cultivadas nas passagens 7 (CMGW), 1 (CMADP) e 0 (FIB), para serem utilizadas no presente estudo como descrito no item '4.6.1.'.

4.3. Construção do vetor plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO para expressão em glândula mamária

A sequência polipeptídica referente à porção variável do anticorpo humanizado anti-CD3 (scFv), apresentando dupla mutação na porção variável da cadeia leve (dmVL), foi fusionada à região Fc da imunoglobulina IgA1 (arquivo gi:113584), resultando em uma sequência de 245 aminoácidos fora da influência da primeira região constante da cadeia pesada (CH1).

O segmento gênico sintético codificando o FvFc anti-CD3 foi obtido no programa backtranseq (pacote EMBOSS), por retro-transcrição, utilizando as preferências de códons bovinas presentes no arquivo Ebovin.cut. A região codificadora (CDS) do peptídeo sinal de beta caseína bovina (arquivo gi: 162796, posições 26 a 70) foi incorporada ao 5' da construção e a sequência gênica referente ao IRES-FEO (gi: AF004665.1) foi incluída ajustada à construção gênica do anticorpo de interesse. Por fim, foram adicionados um consenso de Kozak em volta do ATG e dois sítios de *Xho* I flanqueando a construção. Esse material foi sintetizado sendo, posteriormente, clonado no vetor de expressão em glândula mamária pBC1 e sequenciado pela empresa GenOne.

4.4. Obtenção do plasmídeo recombinante pBC1-anti-CD3-IRES-FEO em células de *Escherichia coli*

4.4.1. Produção e seleção de colônias celulares recombinantes

Um inóculo com 5 mL de meio LB com tetraciclina (50 µg/mL) e 60 µL da bactéria XL10-Gold, do estoque -80 °C, foi preparado. Esta solução ficou no agitador *overnight* a 37 °C, 260 rpm.

No dia seguinte, utilizando o inóculo, fez-se a transformação bacteriana por cloreto de cálcio (CaCl₂) com o DNA pBC1-anti-CD3-IRES-FEO seguindo o protocolo descrito no manual de Azevedo e colaboradores (2003). Esta técnica consiste na neutralização da carga negativa tanto da membrana celular bacteriana quanto do DNA, pelos íons do CaCl₂, com posterior formação de poros na membrana celular bacteriana provocada por choque térmico, permitindo a entrada do DNA presente no meio para o interior do citoplasma (Azevedo et al., 2003).

A solução final foi plaqueada em LB ágar com ampicilina (150 µg/mL), sendo uma placa de petri com 50 µL e outra com 100 µL de solução, bem como a solução que não foi exposta ao pBC1-anti-CD3-IRES-FEO, utilizada como controle negativo. Para finalizar, as placas foram armazenadas em estufa *overnight* a 37 °C.

No dia seguinte elas foram estocadas a 4 °C até serem utilizadas ou pelo período máximo de 2 semanas.

4.4.2. Obtenção do DNA plasmidial

Foram feitos de dois a cinco pré-inóculos com 5 mL de meio LB, contendo ampicilina (150 µg/mL), adicionado de uma colônia bacteriana isolada da placa de petri proveniente do protocolo descrito no item '4.4.1'. Estes ficaram no agitador a 37 °C por aproximadamente 6 horas. O pré-inóculo que apresentou maior turbidez foi então utilizado para a produção de um inóculo contendo 500 mL de meio LB adicionado de 500 µL do inóculo e ampicilina (100 µg/mL). Este ficou no agitador *overnight* a 37°C, 260 rpm.

Os inóculos que cresceram foram utilizados para a etapa de extração de DNA empregando o kit de maxiprep (QIAGEN®), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi estocado em mini tubos a -20 °C.

4.4.3. Quantificação e verificação de perfil eletroforético do DNA plasmidial

Após passar pela extração, conforme descrito no item `4.4.2`, o DNA plasmidial obtido foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ One/One© Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific™).

Posteriormente, cerca de 150 ng de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,6% corado com brometo de etídeo, nos parâmetros de 30 V por 30 minutos seguidos por 80 V por 1h30. Ao final, o gel de agarose foi analisado no E-Gel Imager (Life Technologies™) a fim de observar os padrões eletroforéticos do DNA plasmidial.

4.4.4. Digestão do pBC1-anti-CD3-IRES-FEO para remoção do DNA bacteriano

O pBC1-anti-CD3-IRES-FEO foi submetido a uma digestão dupla e simultânea utilizando as enzimas de restrição *Sal I* e *Not I* (Thermo Scientific™) com o tampão 0 (Thermo Scientific™), que deveria produzir dois fragmentos de DNA: um de 19.453 pb, referente ao fragmento a ser utilizado, e 5.877 pb, referente ao fragmento de DNA bacteriano a ser extraído.

No sistema de digestão, foram adicionados 3,3 µg de DNA, 3 µL de cada enzima, 5 µL de tampão 0 (volume final de 1X) e água suficiente para um volume final de 50 µL. Este material ficou em banho-maria a 37 °C *overnight*.

Após este período, uma alíquota do sistema de digestão, contendo aproximadamente 100 ng de DNA, foi utilizada para confirmação de digestão e de

caracterização do perfil eletroforético pós-digestão em gel de agarose a 0,6% corado com brometo de etídeo utilizando os parâmetros de 30 V por 30 minutos + 80 V por 1h30.

Ao confirmar a digestão, o restante da reação foi aplicado em gel de agarose a 0,6% corado com brometo de etídeo utilizando os parâmetros de 20 V por 6 h. A maior banda (19.453 pb) foi cortada e armazenada em mini tubos, tendo o DNA extraído utilizando o Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel) seguindo o manual do fabricante. O DNA proveniente deste procedimento foi armazenado em mini tubos a -20 °C.

4.5. Obtenção do plasmídeo recombinante pEF-NEO-GFP em células de *Escherichia coli*

O DNA pEF-NEO-GFP foi cedido pelo pesquisador Eduardo Melo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Este DNA foi submetido às etapas de produção e seleção de colônias celulares recombinantes, obtenção do DNA plasmidial em larga escala e quantificação e verificação de perfil eletroforético do DNA plasmidial obtido seguindo os protocolos descritos, respectivamente, nos itens '4.4.1', '4.4.2' e '4.4.3' deste trabalho.

4.6. Comparação do potencial de transfecção dos tipos celulares estudados utilizando os diferentes kits: lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ e Xfect™

4.6.1. Culturas celulares

Para a realização deste experimento as células foram descongeladas durante 5 s ao ar e 20 s em banho-maria a 37 °C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e o sedimento resultante foi suspenso em meio de cultivo (DMEM com 10% de soro fetal

bovino (SFB) e 1% de Antibiótico-Antimicótico (Gibco®) – Solução que contém penicilina, estreptomicina e anfotericina B). Cada uma das soluções finais foi despejada em uma garrafa individual própria para o cultivo celular. O material ficou em estufa a 37° C com 5% de CO₂ e 70% de umidade tendo o meio de cultivo trocado 2 vezes por semana.

4.6.2. Produção de células geneticamente modificadas

4.6.2.1. Preparo das células para os protocolos de transfecção celular

O meio de cultivo presente nas garrafas foi descartado e uma quantidade adequada de meio tripsina, variando dependendo do tamanho da garrafa, foi adicionada ficando em repouso de 3 a 5 min a 37 °C. As garrafas foram analisadas em microscópio óptico e, quando necessário, as células foram descoladas de forma manual por pipetagens.

O meio foi coletado em tubos de 15 mL e centrifugado a 1.800 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 2 mL de meio DMEM, repetindo a centrifugação. Ao final do processo as células foram suspensas em 1 mL de meio DMEM.

A contagem celular foi realizada na Câmara de Neubauer e para encontrar a concentração final (CF) foi aplicada a fórmula:

$$CF_{(Células/mL)} = n^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição}^* \times 10^4$$

* O fator de diluição utilizado neste trabalho foi de 1:10

Cada tipo celular foi plaqueado na concentração de $5,0 \times 10^5$ em placas de cultura de 12 poços, prevendo o experimento em duplicata para cada tratamento com 1 mL de meio de cultivo completo. As passagens nas quais as células foram transfectadas foram, respectivamente, P 7, P 5 e P 4 para as células mesenquimais da geleia de Wharton, do tecido adiposo e para os fibroblastos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e 70% de umidade *overnight*.

4.6.2.2. Protocolos de transfecção celular empregando os diferentes kits a serem testados

As células foram transfectadas no dia seguinte seguindo os protocolos descritos pelos fabricantes do lipossomo lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ (Thermo Scientific™) e do polímero catiônico Xfect™ (Clontech). As quantidades de reagentes e DNA foram adaptados para a placa de 12 poços.

Para cada um dos kits de transfecção foram realizados 2 tratamentos: no primeiro grupo apenas o DNA pEF-NEO-GFP foi utilizado (identificado como GFP), já no segundo grupo realizou-se uma co-transfecção contendo tanto o pEF-NEO-GFP quanto o pBC1-anti-CD3-IRES-FEO em quantidades iguais (identificado como pBC1-GFP). O controle foi feito com células que não passaram por nenhum tratamento.

4.6.3. Análises pós-transfecção nos diferentes grupos celulares

4.6.3.1. Análise de expressão de GFP

As células foram analisadas em microscópio de fluorescência 24 e 48 horas após a transfecção celular, utilizando o laser próprio para a identificação da GFP com excitação a 488 nm. Fotos em aumento de 10x foram obtidas de forma aleatória de todos os poços a fim de visualizar a presença ou não de células transfectadas.

4.6.3.2. Análise da mediana de fluorescência e da morfologia celular

Após a análise de 48 h em microscopia de fluorescência, um dos poços de cada tratamento foi preparado para a análise por citometria de fluxo. Estas células tiveram o meio de cultivo removido e substituído por solução de tripsina, ficando em repouso a

37 °C por 2 min. Após este período, elas foram analisadas em microscópio óptico e, havendo necessidade, foram descoladas manualmente.

A solução contendo as células ressuspensas foi coletada em mini tubos e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de meio PBS com 2% de SFB foi adicionado para fazer a lavagem do precipitado de células formado, repetindo a centrifugação. A etapa de lavagem foi realizada 5 vezes e, ao final, o material foi ressuspenso em 1 mL de meio PBS com 2% de SFB.

As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) utilizando principalmente o canal de leitura FL1-H, que identifica a fluorescência emitida pela GFP gerando um gráfico da mediana de fluorescência dos diferentes tratamentos.

4.6.3.3. Verificação da presença do pBC1-anti-CD3-IRES-FEO nas células transformadas por reação em cadeia de polimerase (PCR)

4.6.3.3.1. Preparo das células transformadas e selecionadas para análise por PCR

Os poços que não foram utilizados para a análise de citometria de fluxo foram submetidos à pressão seletiva em meio contendo geneticina (1 mg/mL), sendo trocado duas vezes por semana.

Ao completar as duas semanas do início do tratamento as células foram preparadas para a análise de PCR em processo semelhante ao descrito no item '4.6.3.2', mudando apenas o meio utilizado para as lavagens que, neste caso, foi o meio DMEM puro e o número de lavagens, que foram apenas duas. Ao final do protocolo todo o sobrenadante foi removido e os tubos foram armazenados a -80 °C até a realização do próximo procedimento.

O DNA genômico das linhagens celulares transfectadas e não-transfectadas com o plasmídeo pBC1-anti-CD3-IRES-FEO foi extraído utilizando o protocolo adaptado de Medina-Acosta e Cross (1993). O material foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ One/One© Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific™) e estocado a -20 °C.

4.6.3.3.2. Análise das amostras

O programa Primer3 foi usado para desenhar os iniciadores (**Tabela 2**) com a finalidade de identificar a presença, ou não, do pBC1-anti-CD3-IRES-FEO no DNA genômico extraído das amostras. Uma vez identificados e sintetizados eles foram utilizados, juntamente com o DNA genômico previamente extraído, nas reações de PCR. O controle positivo foi realizado com o pBC1-anti-CD3-IRES-FEO proveniente da maxiprep e o controle negativo foi realizado com o material extraído das células que não foram transfectadas com este plasmídeo.

Tabela 2: Sequência e anelamento de ambos os iniciadores e tamanho do amplicon resultante da reação em cadeia de polimerase.

	Sequência	Anelamento	Amplicon
Primer for	5' - GCC TCG ATC CTC CCT TTA TC - 3'	54,7 °C	255 pb
Primer rev	5' - AGA CCC CTA GGA ATG CTC GT - 3'	57,7 °C	

A PCR foi realizada contendo 1 µL de cada dNTP (0,2 mM cada), 2 µL de MgCl₂ (2 mM), 5 µL de tampão da *Taq* polimerase platinum (1X), 1,5 µL de cada iniciador (0,3 µM), 0,2 µL de *Taq* polimerase platinum (1U), 1 µL de DNA genômico (≈ 20 ng) em um volume final de 50 µL.

Os parâmetros de amplificação consistiram em: 1 ciclo de 94 °C/5min, 30 ciclos de 94 °C/1 min + 58 °C/30 s + 72 °C/2 min, finalizando com 1 ciclo de 72 °C/5 min em um termociclador. Ao final do processo as amostras foram analisadas, juntamente com o marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder, por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (50 ng/ml) e as imagens foram digitalizadas utilizando E-Gel Imager (Life Technologies™).

4.7. Análise estatística

Os dados da mediana de fluorescência encontrados na análise de citometria de fluxo para ambos tratamentos foram avaliados utilizando o programa Sigma Plot 12. Para verificação estatística foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) e teste T, ao nível de probabilidade de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção dos DNA de interesse em células e *Escherichia coli*

Os DNA plasmidiais pBC1-anti-CD3-IRES-FEO e pEF-NEO-GFP passaram tanto pela a etapa de transformação bacteriana pelo método de CaCl₂, quanto pela etapa de multiplicação empregando o kit de maxiprep. Ambas as etapas foram bem-sucedidas, de forma que quantidades suficientes destes DNA foram obtidas (> 100 µg) para utilização nas demais etapas do trabalho.

5.2. Remoção do DNA de origem bacteriana do plasmídeo pBC1-anti-CD3-IRES-FEO

A digestão do DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO realizada utilizando as enzimas de restrição *Sal* I e *Not* I foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose (**Fig. 3**). O material por vezes apresentou uma digestão parcial, sendo necessário deixar a digestão proceder por mais tempo.

O DNA digerido foi submetido a análise por eletroforese em gel de agarose apresentando as duas bandas de tamanhos esperados, sendo a maior delas, de 19.453 pb, cortada. Após ser purificado em kit, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro mostrando quantidades insatisfatórias.

A taxa de recuperação do plasmídeo para cada digestão foi inferior a 20%, desta forma, a quantidade de DNA acumulada (cerca de 5 µg) foi insuficiente para a realização da etapa de transfecção celular, mesmo após repetir este protocolo por diversas vezes. Pela quantidade insuficiente deste DNA plasmidial digerido para a realização do protocolo de transfecção dos diferentes tipos celulares a serem testados, optou-se pelo uso do DNA plasmidial intacto nas próximas etapas do presente trabalho.

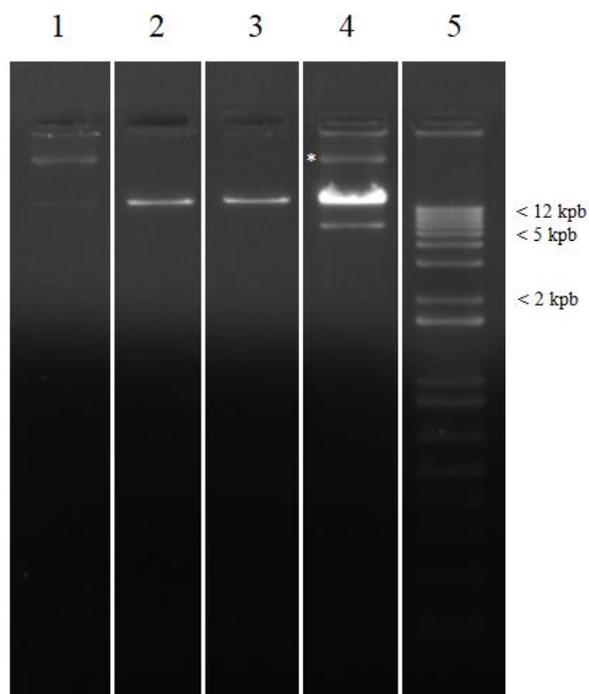


Figura 3: Perfil eletroforético de digestão do DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO com as enzimas de restrição *Not I* e/ou *Sal I*. 1- Controle negativo de digestão (DNA plasmidial intacto); 2- DNA plasmidial digerido apenas com *Not I* (linearização do DNA plasmidial); 3- DNA plasmidial digerido apenas com *Sal I* (linearização do DNA plasmidial); 4- DNA plasmidial digerido com *Not I* e *Sal I* / (*) – Resquício de DNA intacto; 5- Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder.

5.3. Cultivo celular

Os fibroblastos e as células mesenquimais das duas diferentes origens apresentaram perfis de crescimentos distintos, de forma que as células mesenquimais isoladas do tecido adiposo (CMADP) cresceram mais rapidamente, seguidos pelos fibroblastos (FIB) e, por último, pelas células mesenquimais isoladas da geleia de Wharton (CMGW).

Em questão de menos de uma semana as CMADP e os FIB apresentaram-se confluentes em garrafas de cultivo pequenas. Por este motivo, elas foram transferidas para uma garrafa grande a fim de evitar manipulações frequentes e, também, para conseguir uma quantidade de células adequada para a etapa de transfecção celular.

Já as CMGW apresentaram um desenvolvimento muito lento, mesmo em garrafa pequena, ficando em crescimento por 3 semanas sem atingir confluência, mesmo assim, elas foram passadas para uma garrafa média a fim de conseguir uma quantidade de células satisfatória para a transfecção celular.

5.4. Transfecção celular

Ao analisar as CMADP e os FIB em microscópio óptico antes de realizar o protocolo de transfecção, observou-se que a grande maioria das células se encontravam aderidas aos poços da placa de cultivo. Já as CMGW apresentaram uma grande quantidade de células em suspensão no meio de cultivo antes mesmo do tratamento ser realizado.

5.5. Análises pós-transfecção

5.5.1. Microscopia de fluorescência

As CMADP foram as únicas que apresentaram fluorescência em todos os tratamentos (**Fig. 4**) já nas primeiras 24 h após a transfecção. Nestas células o tratamento GFP Xfect (**Fig. 4C**) aparentou ter um maior número de células transfectadas, no entanto, o tratamento pBC1-GFP LTX (**Fig. 4D**) aparentou uma maior intensidade de fluorescência.

Já os FIB apresentaram uma quantidade de células transfectadas notoriamente inferior às CMADP em todos os tratamentos (**Fig. 5**) na análise de 24 h. No tratamento GFP LTX (**Fig. 5B**) não foi detectada nenhuma célula transfectada.

Nota-se que ambas as células, CMADP e FIB, multiplicaram-se rapidamente no curto período de tempo entrando em confluência, impedindo a contagem celular.

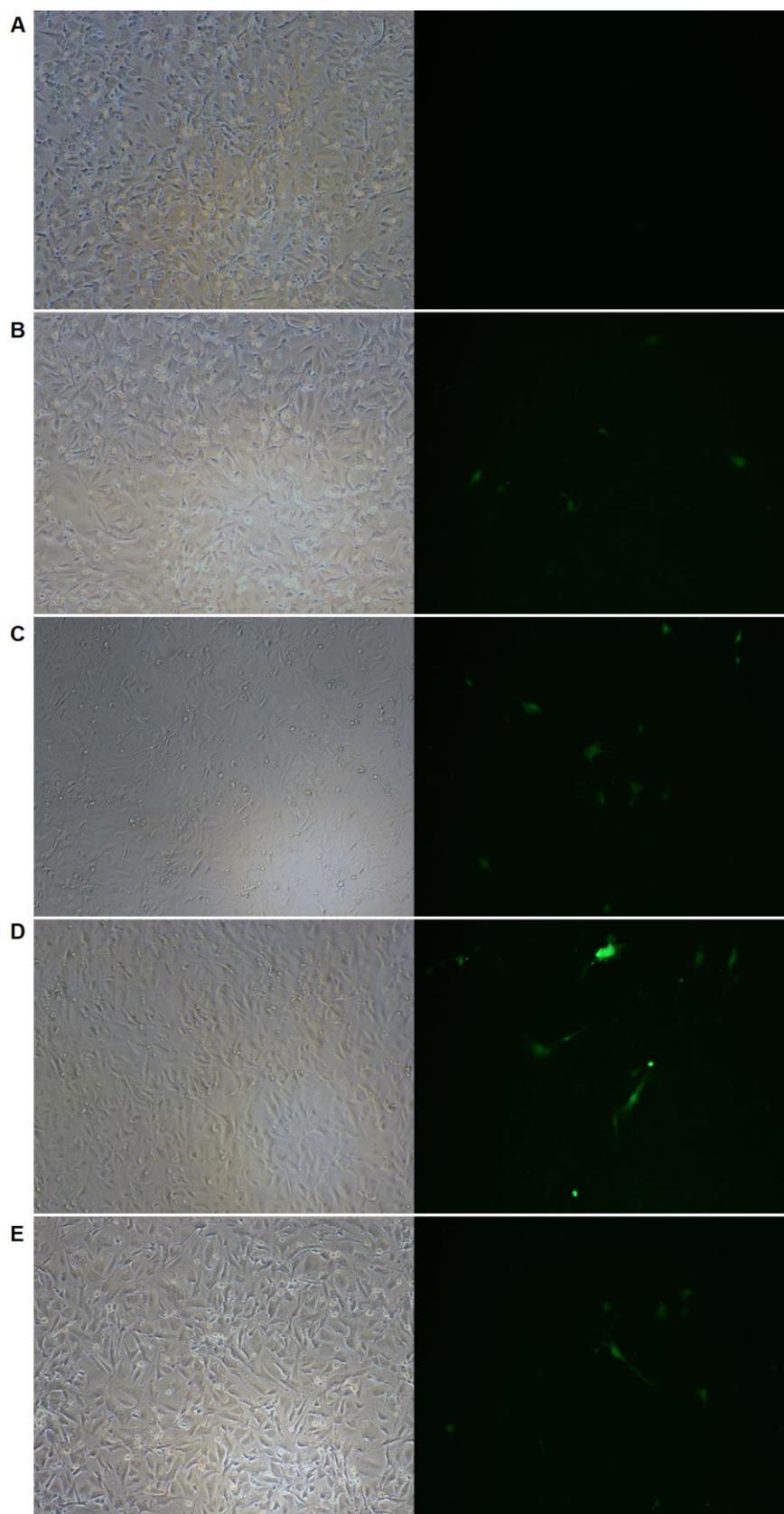


Figura 4: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas do tecido adiposo após 24 h da transfecção celular. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Tratamento pBC1-GFP LTX; E- Tratamento pBC1-GFP XFECT.

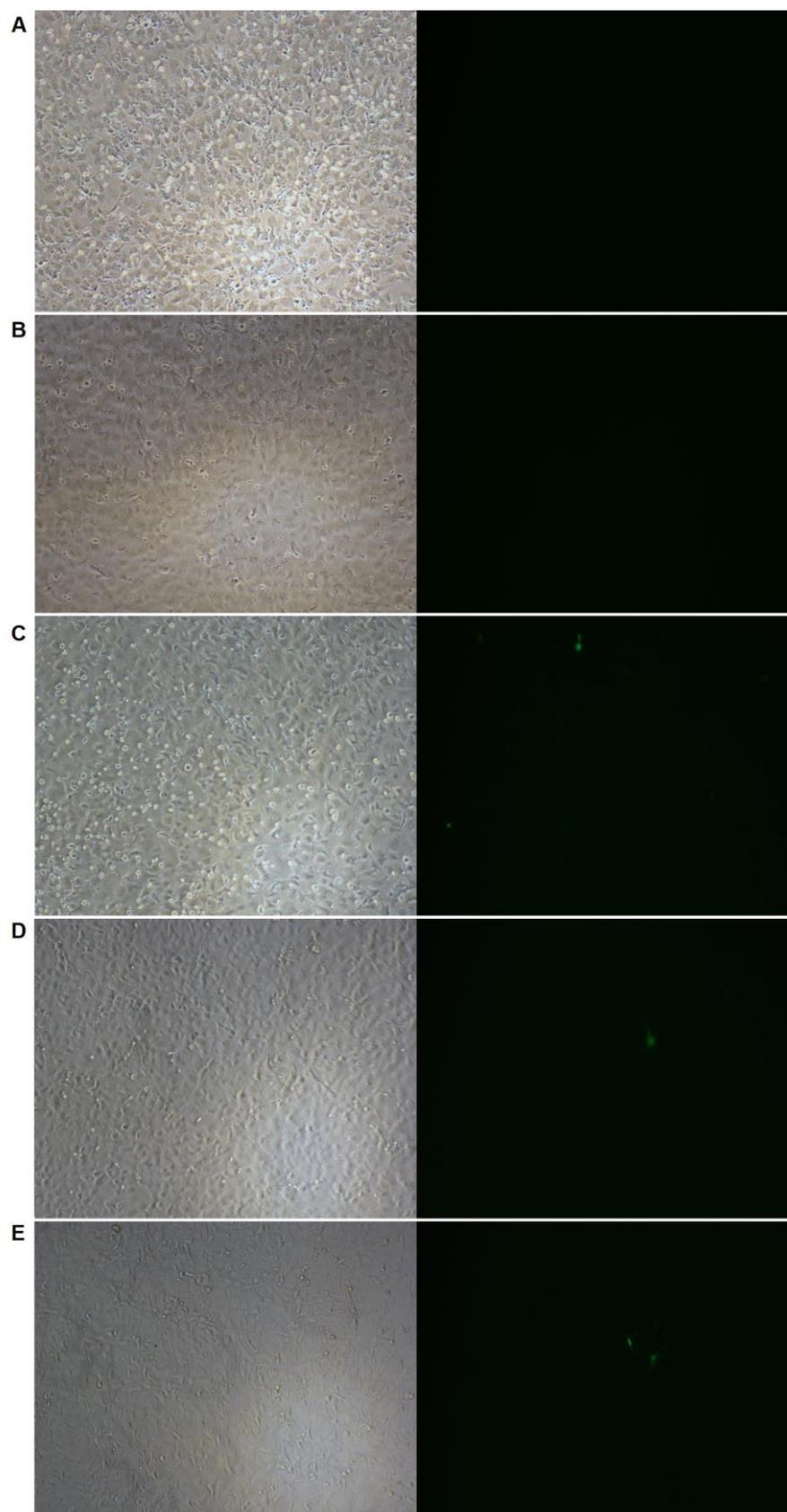


Figura 5: Microscopia de fluorescência dos fibroblastos após 24 h da transfecção celular. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Tratamento pBC1-GFP LTX; E- Tratamento pBC1-GFP XFECT.

As CMGW não responderam bem ao tratamento (**Fig. 6**), apresentando muitas células mortas e debris celulares. Apenas o tratamento pBC1-GFP XFECT (**Fig. 6E**) apresentou uma única célula fluorescente, nos demais tratamentos apenas artefatos foram encontrados.

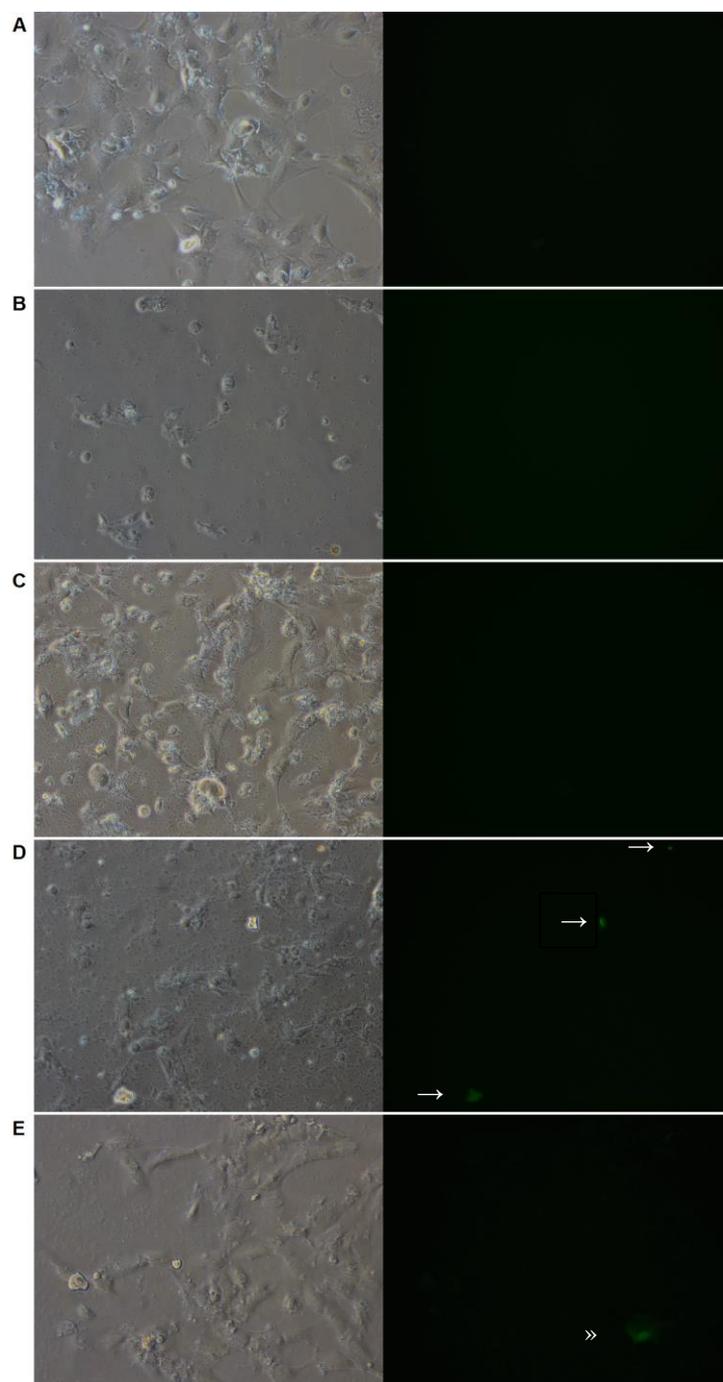


Figura 6: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas da geleia de Wharton após 24 h da transfecção celular. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Tratamento pBC1-GFP LTX / → - Artefato; E- Tratamento pBC1-GFP XFECT / » única GW transfectada.

Após 48 h do protocolo de transfecção celular ser realizado, as células foram novamente avaliadas e fotografadas. As CMADP permaneceram sendo o grupo celular que apresentou a melhor resposta aos tratamentos, além de aparentar um aumento considerável na expressão de GFP entre as avaliações realizadas (**Fig. 7**).

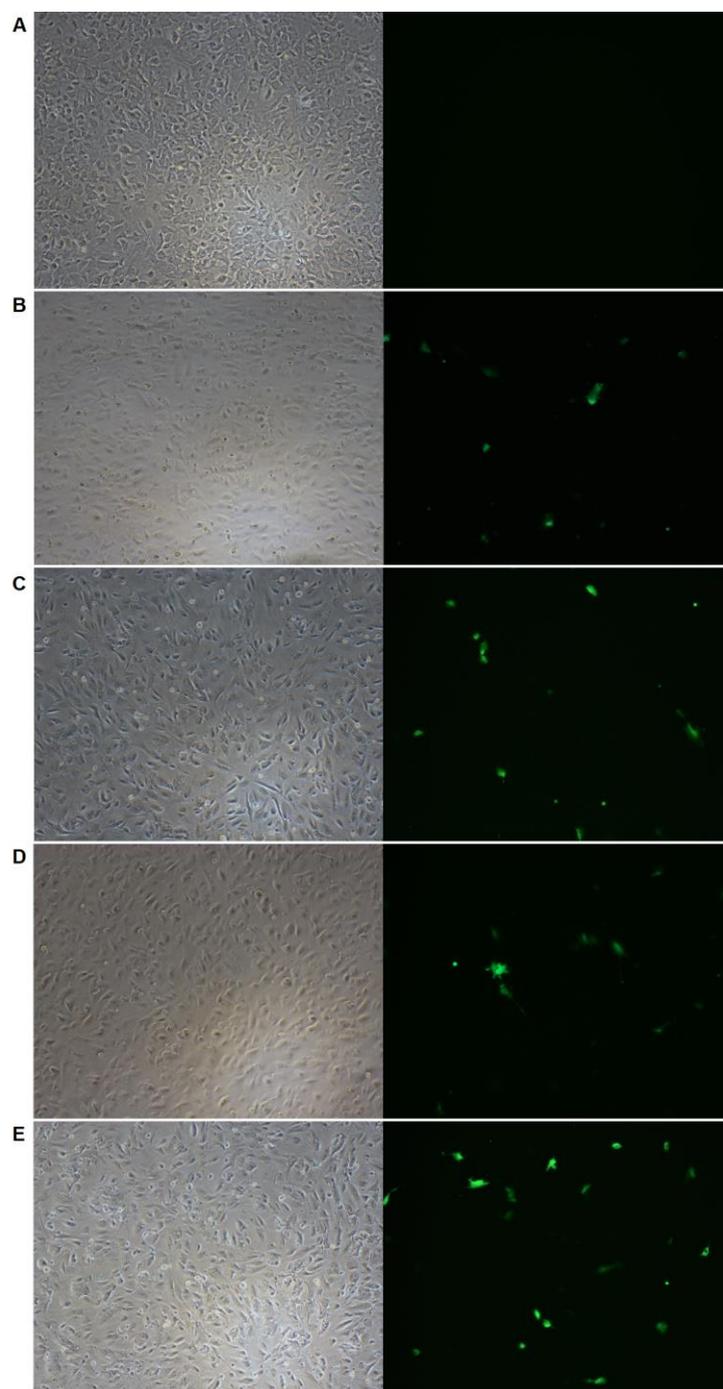


Figura 7: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas do tecido adiposo após 48 h da transfecção celular. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Tratamento pBC1-GFP LTX; E- Tratamento pBC1-GFP XFECT.

Os FIB apresentaram, de forma geral, uma melhora na expressão da GFP na análise de 48 h (**Fig. 8**), inclusive no tratamento GFP LTX (**Fig. 8B**), que não havia apresentado nenhum indício de fluorescência na avaliação anterior. No entanto, o tratamento pBC1-GFP LTX (**Fig. 8D**) não apresentou melhora nos resultados.

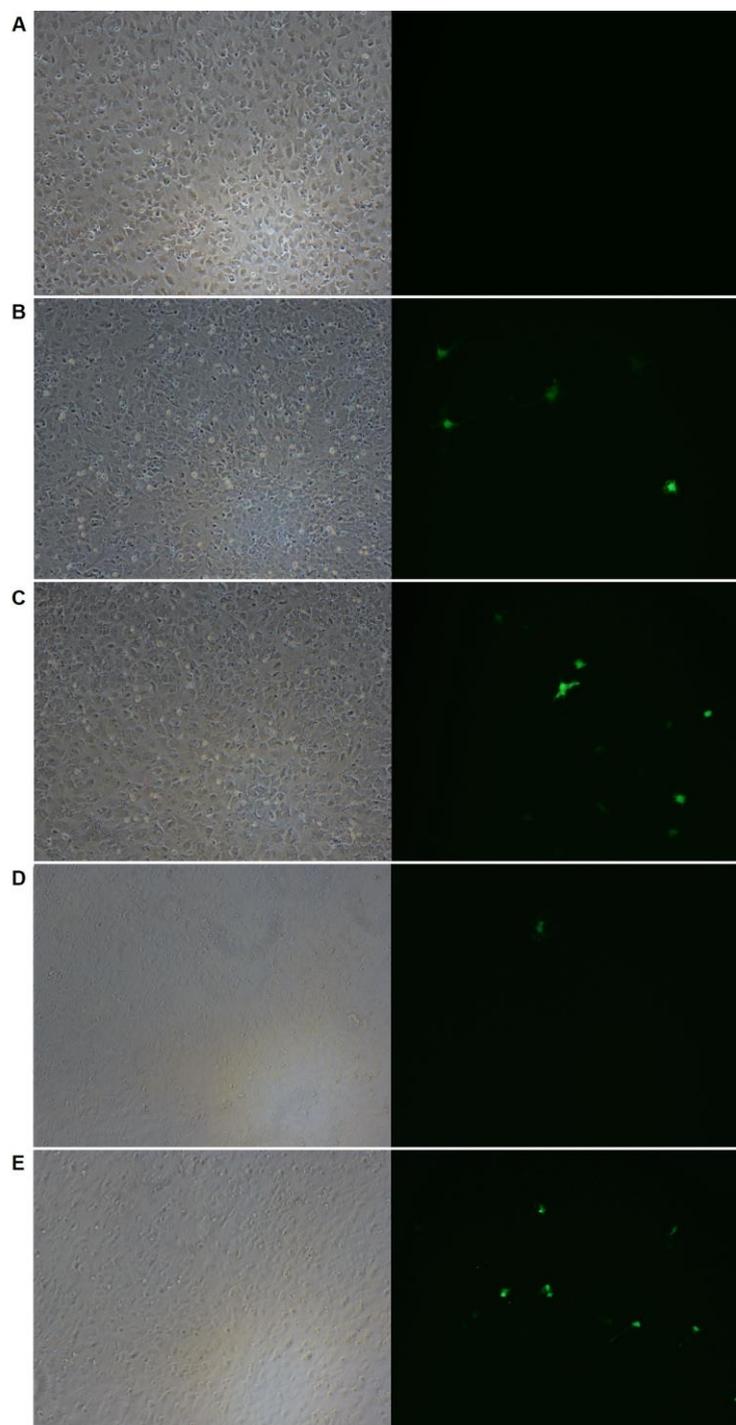


Figura 8: Microscopia de fluorescência dos fibroblastos após 48 h da transfecção celular. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Tratamento pBC1-GFP LTX; E- Tratamento pBC1-GFP XFECT.

As CMGW permaneceram com resultados insatisfatórios, apresentando apenas uma célula fluorescente e muitas células em suspensão (Fig. 9).

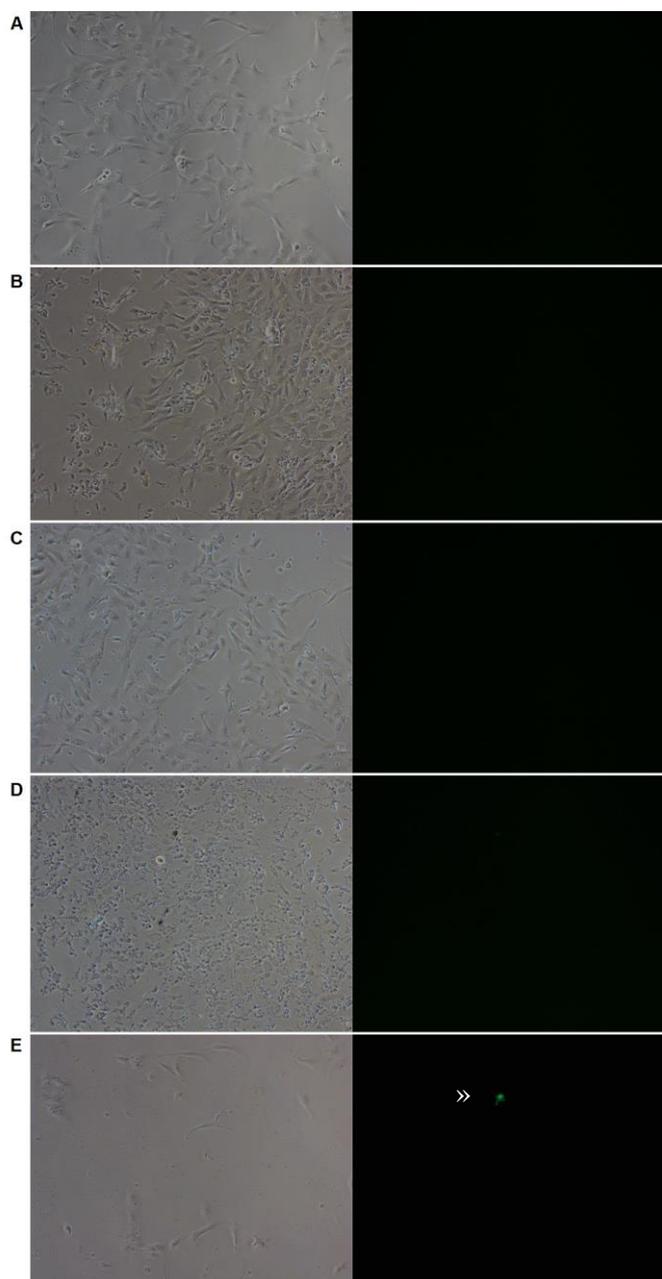


Figura 9: Microscopia de fluorescência das células mesenquimais isoladas da geleia de Wharton após 48 h da transfecção celular. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Tratamento pBC1-GFP LTX; E- Tratamento pBC1-GFP XFECT / » única GW transfectada.

Pela dificuldade de cultivo celular, impossibilitando a repetição do experimento para confirmação dos padrões apresentados, e pelos resultados insatisfatórios na transfecção, as CMGW não passaram por outras avaliações.

5.5.2. Análise em citometria de fluxo

Analisando os gráficos de pontos das amostras de células mesenquimais isoladas do tecido adiposo, observa-se que todos os tratamentos apresentam um aumento notório no tamanho (eixo FSC-A) e na granulosidade (eixo SSC-A) celular quando comparados ao controle (**Fig. 10**).

As curvas de mediana de fluorescência (MF) de todas as amostras das CMADP foram analisadas e apresentaram um deslocamento a direita, em maior ou menor grau, quando comparadas à curva de MF do controle (**Fig. 10**). Esse deslocamento representa um aumento da fluorescência nas amostras analisadas referente à expressão de GFP nas células transfectadas.

Dentre os tratamentos realizados com este grupo celular, quando comparados ao controle (MF= 11.690,0), o tratamento GFP XFECT (**Fig. 10C**) apresentou o melhor resultado (MF = 21.203,0), já o tratamento pBC1-GFP XFECT (**Fig. 10F**) apresentou o pior resultado (MF= 18.911,5).

As amostras dos FIB também apresentaram uma alteração na morfologia celular dos diferentes tratamentos em relação ao controle, representada no gráfico de pontos (**Fig. 11**). Esta alteração foi mais significativa em relação à granulosidade celular e não tanto em relação ao seu tamanho.

As curvas de fluorescência dos diferentes tratamentos dos FIB demonstraram um deslocamento muito discreto a direita, por vezes, quase se sobrepondo a curva de MF do controle, demonstrando uma baixa taxa de transfecção.

Foi observado também que os resultados obtidos pelas CMADP se repetiram com os FIB. Os tratamentos GFP XFECT (**Fig. 11C**) (MF= 11.098,0) e pBC1-GFP XFECT (**Fig. 11C**) (MF= 10.104,0) representam o melhor e o pior resultado, respectivamente, quando comparados ao controle (MF= 8.487,0).

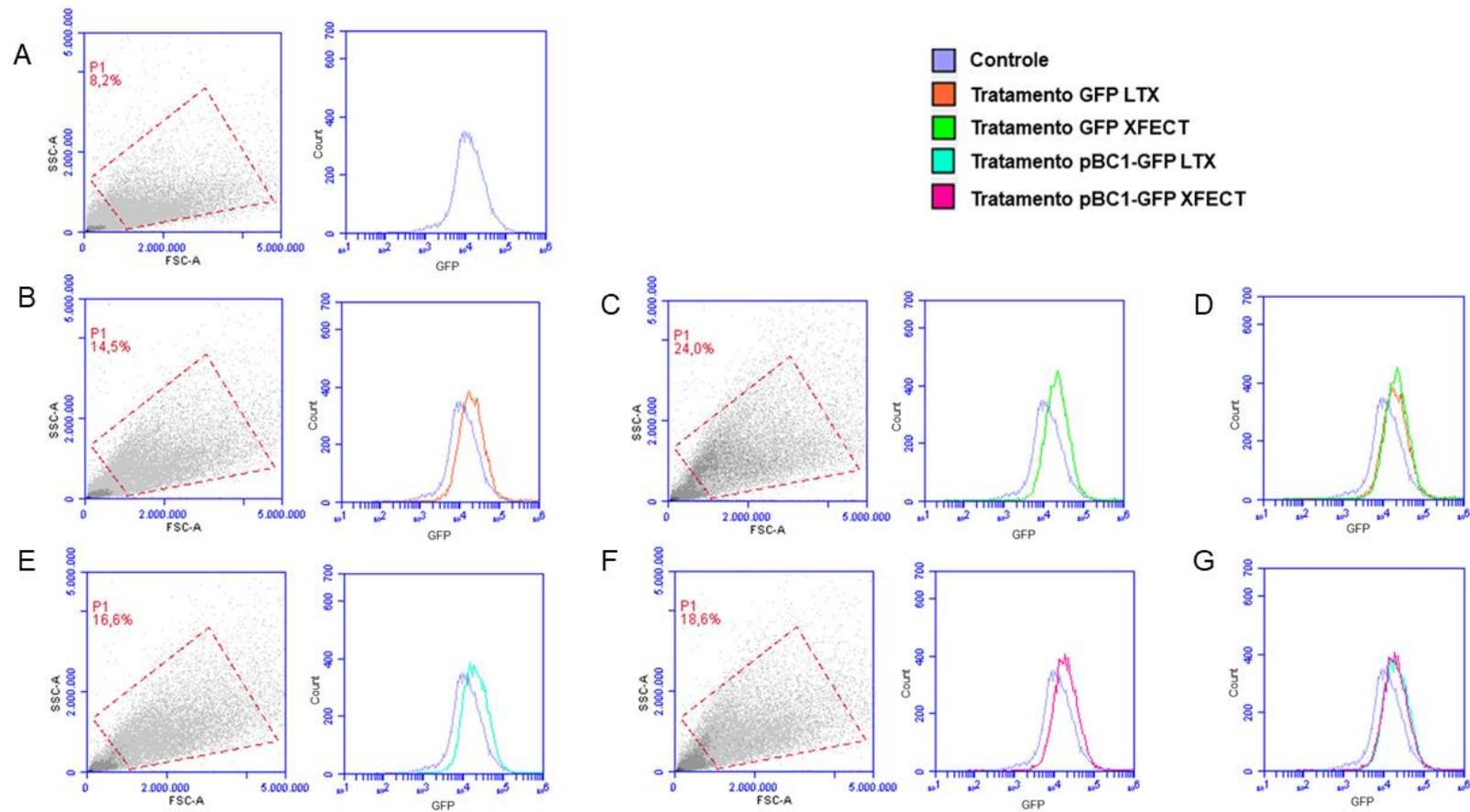


Figura 10: Gráfico de pontos e gráfico da mediana de fluorescência (MF) referentes à análise por citometria de fluxo dos diferentes tratamentos para as células mesenquimais isoladas do tecido adiposo. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP Xfect; D- Junção das curvas de MF dos gráficos A, B e C; E- Tratamento pBC1-GFP LTX; F- Tratamento pBC1-GFP Xfect; G- Junção das curvas de MF dos gráficos A, E e F.

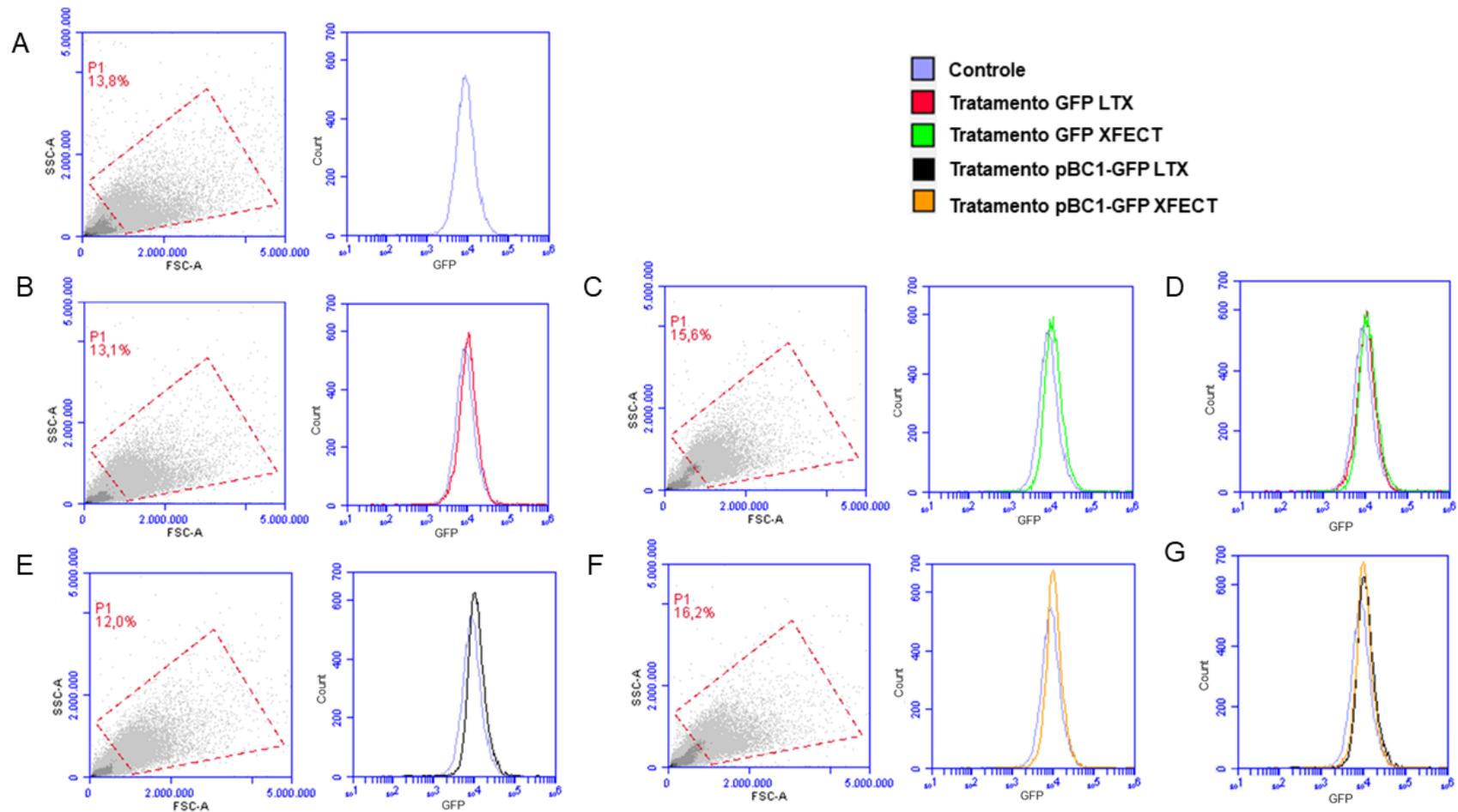


Figura 11: Gráfico de pontos e gráfico da mediana de fluorescência (MF) referentes à análise por citometria de fluxo dos diferentes tratamentos para os fibroblastos. A- Controle; B- Tratamento GFP LTX; C- Tratamento GFP XFECT; D- Junção das curvas de MF dos gráficos A, B e C; E- Tratamento pBC1-GFP LTX; F- Tratamento pBC1-GFP XFECT; G- Junção das curvas de MF dos gráficos A, E e F.

A análise estatística (**Tabela 3**) demonstrou que houve diferença significativa entre os tipos celulares utilizados, ou seja, o tipo celular interfere na taxa de transfecção celular. Neste experimento as células mesenquimais isoladas do tecido adiposo apresentaram taxas de transfecção superiores aos fibroblastos. No entanto, os diferentes kits de transfecção utilizados não apresentaram diferença significativa.

Tabela 3. Mediana de fluorescência para os diferentes tratamentos de transfecção em células mesenquimais isoladas do tecido adiposo e fibroblastos bovinos.

Tratamentos	Fluorescência Adipócitos	Fluorescência Fibroblastos
XFECT	20.057±1.620,7 ^{aA}	10.601±702,86 ^B
LTX	19.590±113,84 ^{aA}	10.518±442,65 ^B
Controle	10.089±2.264,9 ^b	10.089±2.264,9

Diferenças significativas ($p < 0,05$) são indicadas por letras minúsculas diferentes^{ab} nas colunas e letras maiúsculas diferentes^{AB} nas linhas.

5.5.3. Análise de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Ao final do processo de extração de DNA genômico das amostras de co-transfecção e de controle das CMADP e dos FIB o DNA extraído foi quantificado apresentando DNA genômico suficiente para a realização da análise por PCR.

No primeiro teste realizado com o controle positivo – pBC1-anti-CD3-IRES-FEO proveniente de maxiprep – a fim de verificar a funcionalidade dos iniciadores e confirmar o protocolo de PCR, um fragmento de 255 pb foi amplificado, como era esperado (**Fig. 12**).

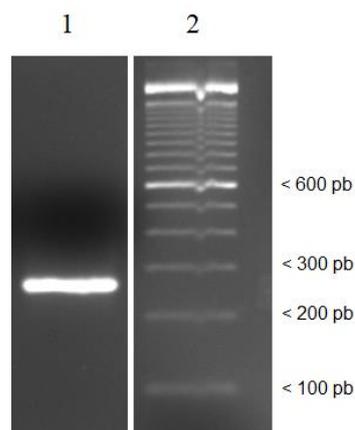


Figura 12: Perfil eletroforético do DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO proveniente da maxiprep (Controle positivo) após realização da análise por reação em cadeia da polimerase. 1- Fragmento do DNA pBC1-anti-CD3-IRES-FEO (controle positivo) amplificado em PCR; 2 – Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder.

Com o protocolo estabelecido as amostras de DNA genômico extraídas das CMADP e dos FIB transfectados com o DNA de interesse foram submetidas à análise por PCR.

Tanto os FIB (**Fig. 13**) quanto as CMADP (**Fig. 14**) tiveram todas as amostras amplificadas. Este experimento comprova a presença do DNA de interesse nas células transfectadas após as duas semanas de cultivo sob pressão seletiva com geneticina.

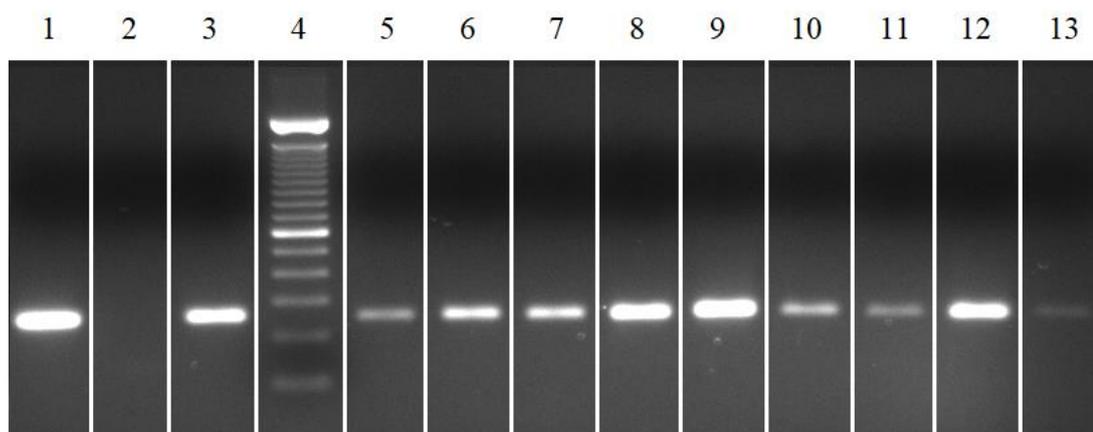


Figura 13: Perfil eletroforético da análise por PCR realizada com as amostras de material genômico extraídas dos fibroblastos após duas semanas em cultivo sob pressão seletiva com geneticina. 1- Controle Positivo; 2- Controle Negativo; 4- Marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder; 3, 5, 8, 9 e 12 – Amostras do tratamento pBC1-GFP LTX de diferentes transfecções; 6, 7, 10, 11 e 13 - Amostras do tratamento pBC1-GFP XFECT de diferentes transfecções.

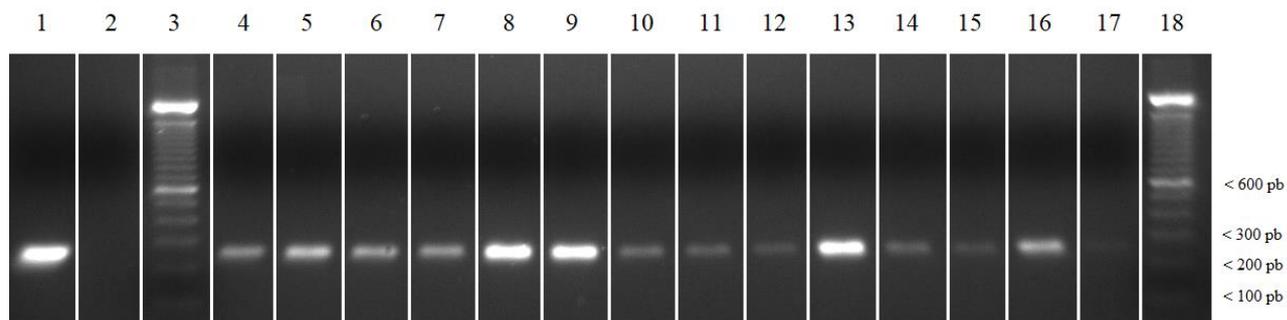


Figura 14: Perfil eletroforético da análise por PCR realizada com as amostras de material genômico extraídas das células mesenquimais isoladas do tecido adiposo após duas semanas em cultivo sob pressão seletiva com geneticina. 1- Controle Positivo; 2- Controle Negativo; 3 e 18- Marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder; 4, 5, 8, 9, 12, 13, 16 - Amostras do tratamento pBC1-GFP LTX de diferentes transfecções; 6, 7, 10, 11, 14, 15, 17 - Amostras do tratamento pBC1-GFP XFECT de diferentes transfecções.

6. DISCUSSÃO

A demanda por biofármacos vem crescendo a cada ano levando a uma busca tanto por sistemas mais eficientes para a sua síntese em larga escala quanto por estratégias que apresentem um baixo custo de produção, refletindo nos altos preços dos medicamentos.

A secreção de proteínas recombinantes no leite bovino pode possibilitar altos rendimentos na produção heteróloga de fármacos e justificar a tecnologia de produção destes animais transgênicos biorreatores.

A comercialização do primeiro fármaco produzido por animal biorreator, ATryn® – forma recombinante da antitrombina humana produzida no leite de cabras transgênicas, foi autorizada na União Europeia em 2006 (Schmidt, 2006) e, posteriormente, nos Estados Unidos em 2009 (Kling, 2009), sendo um grande incentivo para investimentos nesta tecnologia.

No presente trabalho foi hipotetizado que a construção de um vetor de expressão em glândula mamária contendo o gene anti-CD3 humanizado poderia ser integrada em células tronco mesenquimais bovinas. Estas, uma vez desenvolvidas, poderiam ser utilizadas na técnica de transferência nuclear a fim de produzir fêmeas transgênicas produtoras do anticorpo monoclonal de interesse no leite, que, por sua vez, seria isolado e processado.

No entanto, esta abordagem apresenta etapas complexas e alguns desafios necessitam ser superados previamente, tais como: o tipo celular de eleição para transfecção e uso na clonagem de bovinos; introdução do plasmídeo no genoma e expressão do transgene a nível desejado, além do aumento da taxa de embriões reconstruídos e de gestações de embriões transgênicos (Lisauskas et al., 2007).

Dentro deste contexto, este estudo desenhou e construiu o gene do anti-CD3 humanizado (IgA) clonando-o no vetor comercial para expressão em glândula mamária: pBC1. Testou a eficiência de dois kits de transfecção, lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ (Thermo Scientific™) e o Xfect™ (Clontech), com a intenção de integrar o DNA plasmidial ao genoma celular. Bem como, avaliou a estratégia de co-transfecção em células tronco mesenquimais do tecido adiposo bovino. Desta forma, este trabalho configura-se no primeiro estudo para a avaliação do potencial de transfecção e co-transfecção em células tronco mesenquimais adultas de bovino, prevendo um aumento da eficiência da produção de embriões transgênicos clonados.

Em estudos anteriores, melhor explorados na introdução do presente trabalho, demonstrou-se a eficiência do anti-CD3 na prevenção e tratamento contra a rejeição de órgãos transplantados. Por ser de origem murina, os pacientes desenvolviam uma reação imunogênica contra o medicamento (efeito HAMA), que perdia a sua eficiência e, por esta razão, seu uso foi descontinuado (Chatenoud et al., 1986; Kimball et al., 1995).

Desde então muitos esforços foram gerados para a produção do anti-CD3 humanizado, tendo em vista a sua relevância à saúde pública. No laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, este anticorpo já é estudado e produzido a níveis celulares pela equipe dos professores Marcelo Brígido e Andrea Maranhão. Este trabalho traz a possibilidade de aumento significativo na produção deste bioproduto por meio de bovinos biorreatores.

Para registrar um animal transgênico é indicado que ele apresente o mínimo de alterações possíveis em seu genoma. Não é recomendado que o animal apresente DNA de origem bacteriana e, visando às etapas futuras, optou-se por realizar a digestão deste plasmídeo.

Após a análise em espectrofotômetro observou-se quantidades muito baixas do DNA plasmidial, com taxa de recuperação inferior a 20%. Isso pode ter acontecido em decorrência do tamanho do DNA, que supera em aproximadamente 5 kb o tamanho máximo indicado pelo protocolo (20 kb). Por este motivo, ele pode ter ficado retido na coluna de eluição, o que prejudica a sua taxa de recuperação. Como o material era insuficiente para realizar a transfecção celular, foi decidido utilizar o DNA intacto na realização desta etapa.

A técnica de transfecção celular consiste na introdução de um material genético exógeno na célula de interesse e pode ocorrer de forma estável ou transiente, ou seja, o material pode ser introduzido ao genoma celular e continuar sendo expresso após replicação celular ou pode ser expresso de forma passageira pela célula transfectada (Kim e Eberwine, 2010).

Esta técnica pode ser classificada como: biológica, quando mediada, por exemplo, por vírus; química, quando polímeros catiônicos, lipídeos catiônicos, aminoácidos catiônicos, entre outras substâncias, são empregados na produção da célula geneticamente modificada; ou física, quando se realiza metodologias como a eletroporação ou a microinjeção, por exemplo (Kim e Eberwine, 2010).

Neste trabalho a transfecção química por lipossomo e polímero catiônicos foi a metodologia eleita. Esta escolha se deu pelas características de baixa citotoxicidade, não promoção de mutação celular e permissão de uso de DNA maiores (Kim e Eberwine, 2010). A literatura consultada também apresentou relatos positivos na transfecção de fibroblastos de diferentes animais de produção utilizando polímero catiônico (Zhu et al., 2016) e lipossoma catiônico (Shim et al., 2013), com resultados superiores quando associado ao reagente PLUS™ (Oliveira et al., 2005), influenciando nesta escolha.

Tendo em vista que os kits de transfecção, lipofectamine® LTX com reagente PLUS™ e Xfect™, utilizados neste estudo indicam o pico de expressão com 48 h após, foi observado precocemente (nas primeiras 24 horas) células fluorescentes em todos os tratamentos de transfecção realizados nas células mesenquimais isoladas do tecido adiposo (CMADP). Mesmo essa expressão podendo ser transiente, estes achados comprovam o sucesso da transfecção e da co-transfecção neste grupo celular.

Contrariamente, uma resposta inferior foi observada para todos os tratamentos realizados nos fibroblastos nas primeiras 24 h. Este achado não indica que o procedimento não foi bem-sucedido para este grupo celular, mesmo apresentando um dos tratamentos sem nenhuma célula com expressão de GFP, pois, para ter uma avaliação definitiva, é necessário aguardar 48 h após a transfecção ser realizada.

Tanto a lipofectamine® LTX quanto o Xfect™ aparentaram ser mais citotóxicos para as células mesenquimais isoladas da geleia de Wharton (CMGW) já na primeira avaliação, uma vez que foram observadas muitas células em suspensão e debris celulares, indicando morte celular, em todos os tratamentos. Apenas o tratamento pBC1-GFP XFECT apresentou expressão de GFP, os demais apresentaram apenas artefatos. Estes achados são indicadores desfavoráveis à transfecção destas células.

Na segunda análise de microscopia de fluorescência, realizada 48 h após a transfecção, verificou-se um aumento tanto no número de células fluorescentes quanto na intensidade de fluorescência, ratificando o sucesso de todos os tratamentos de transfecção e co-transfecção para as CMADP.

Este dado corrobora com os achados de Enlund e colaboradores (2014), que demonstraram a eficiência da transfecção de adipócitos humanos utilizando lipossomas catiônico, onde a lipofectamine® 2000 foi mais eficiente que o *SreenFact A*. Um resultado positivo também foi observado em adipócitos bovinos, no entanto, o método

de transfecção utilizado foi o *GeneJamer transfection reagent*, uma formulação de poliaminas em solução alcoólica (Indo et al., 2009).

Os fibroblastos também mostraram melhora na expressão de GFP apresentando fluorescência em todos os tratamentos, no entanto, os resultados continuaram inferiores aos visualizados nas CMADP. O resultado insatisfatório neste grupo celular vai contra ao que é observado na literatura, tendo em vista que este é um dos tipos celulares mais estudados para a produção de animais transgênicos (Melo et al., 2005; Lipinski et al., 2012; Meng et al., 2013).

No estudo de Lu e colaboradores (2018) foi demonstrado a eficiência deste grupo celular, no entanto, dos três protocolos testados a eletroporação apresentou o melhor resultado (35,5%), o lipossoma X-tremeGENE ficou em segundo lugar (25,4%) e a lipofectamine® LTX ficou em último (11,7%).

Já as CMGW mantiveram o padrão de fluorescência observado na primeira análise, aumentando apenas o número de células em suspensão e debris presentes nos poços. Isto demonstra uma baixa resposta tanto à transfecção quanto à co-transfecção destas células, além de indicar uma possível intolerância aos métodos de transfecção utilizados neste trabalho.

Apesar de ainda não haver relatos na literatura de células mesenquimais da geleia de Wharton bovinas sendo transfectadas, Mellot e colaboradores (2014) obtiveram resultados interessantes na transfecção deste tipo celular de origem humana utilizando a metodologia de Nucleofection™, uma técnica de eletroporação.

Estes autores demonstraram que, quando associada a um inibidor de Rho-quinase – proteína envolvida na regulação de diversas funções biológicas da célula, as taxas de transfecção e de viabilidade celular aumentaram 4,6 e 3,3 vezes, respectivamente, após 24 h da realização da transfecção. Na análise de 48 h esses valores foram de 4,8 e 3,2

vezes, respectivamente, quando comparadas com o grupo que não recebeu o mesmo tratamento.

Na análise de citometria de fluxo, a curva da mediana de fluorescência mostrou um resultado semelhante ao observado na análise de microscopia de fluorescência, em que as células mesenquimais isoladas do tecido adiposo mostram um melhor desempenho no processo de transfecção em relação aos fibroblastos para os tratamentos LTX e XFECT. Esta análise também demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes kits de transfecção utilizados para os dois tipos celulares.

Analisando o gráfico de pontos da citometria de fluxo, foi possível observar uma alteração na morfologia celular após a transfecção. Esta deformação ocorreu em ambos os tipos celulares analisados, sendo mais perceptível nas CMADP, que tiveram tanto o seu tamanho quanto a sua granulosidade aumentados. Já os fibroblastos apresentaram um aumento basicamente em sua granulosidade, quase não sendo observadas alterações em seu tamanho. No estudo de Mellott e colaboradores (2014) também foi observado um aumento na granulosidade celular após os tratamentos de transfecção.

A lipofectamine® LTX e o Xfect™ agem formando complexos lípideo-DNA ou polímero-DNA, respectivamente. A presença destes complexos no interior celular pode ser responsável pelo aumento da granulosidade observada no teste de citometria de fluxo. Já a deformação do tamanho da célula pode ser consequência não apenas do aumento do conteúdo intracitoplasmático provocado pela presença destas estruturas, mas, também, pelo aumento na taxa de síntese proteica, que ocorre no citoplasma.

Por fim, na análise por PCR, todas as amostras de co-transfecção dos dois tipos celulares foram positivas para o pBC1-anti-CD3-IRES-FEO. Isto indica que este DNA continuou presente nas células transfectadas após as duas semanas de cultivo sob

pressão seletiva com geneticina. No entanto, este teste é insuficiente para afirmar que este DNA está integrado ao material genômico.

Para este fim, a análise por *Southern blot* seria a mais indicada, pois é empregada na identificação de uma sequência de DNA de interesse em uma amostra de DNA. Para isso, o DNA analisado passa por digestão com enzimas de restrição com posterior análise por eletroforese em gel de agarose. O DNA presente no gel passa, então, pelo processo de desnaturação e é transferido para uma membrana de nitrocelulose que, por sua vez, é tratada com uma sonda complementar ou idêntica à sequência de interesse permitido ou não a sua identificação.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que as células tronco mesenquimais isoladas do tecido adiposo apresentaram uma melhor resposta à transfecção quando comparadas aos fibroblastos, independente do método utilizado.

Ficou comprovada também a presença do DNA pBC1-anti-CD3-IRES-FEO no material extraído de ambas as células referentes aos tratamentos de co-transfecção (pBC1-GFP), validando esta abordagem para experimentos futuros.

As células da geleia de Wharton apresentaram um crescimento celular mais lento antes dos tratamentos, o que pode dificultar uma rotina de clonagem. Além disso, foram sensíveis aos diferentes tratamentos de transfecção testados.

8. PERSPECTIVAS

Buscando melhorias para experimentos futuros sugere-se:

- Retirar o DNA de origem bacteriana do DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO utilizando as enzimas de restrição *Not I* e *Sal I*;
- Realizar o experimento de *Southern blot* a fim de verificar a integração do plasmídeo no DNA genômico, ou realizar um cultivo prolongado (mais de 3 semanas) das células transfectadas sob pressão seletiva com geneticina;
- Utilizar as células co-transfectadas com o pBC1-anti-CD3-IRES-FEO mais pEF-NEO-GFP, cultivadas sob pressão seletiva com geneticina, para produção de embriões bovinos;
 - Realizar biópsia no embrião a fim de confirmar a presença do DNA de interesse no DNA genômico do animal antes de transferir para uma vaca receptora.
- Fazer testes *in vitro* de transfecção com células bovinas da glândula mamária com o DNA plasmidial pBC1-anti-CD3-IRES-FEO para observar o comportamento celular ao tratamento e verificar a taxa de expressão do DNA inserido.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- AMIRI-KORDESTANI, L., WEDAM, S., ZHANG, L., TANG, S., TILLEY, A., IBRAHIM, A., JUSTICE, R., PAZDUR, R., CORTAZAR, P. First FDA approval of neoadjuvant therapy for breast cancer: Pertuzumab for the treatment of patients with HER2-Positive Breast Cancer. **American Association for Cancer Research**, p. 5359-5365, 2014.
- AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. 1.ed. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 2003, 212 p.
- BEGUM, S., CHEN, W., HEROLD, K.C, PAPAIOANOU, V.E. Remission of type 1 diabetes after anti-CD3 antibody treatment and transplantation of embryonic pancreatic precursors. **Endocrinology** v. 150, n. 10, p. 4512-4520, 2009.
- BOLT, S., ROUTLEDGE, E., LLOYD, I., CHATENOU, I., POPE, H., GORMAN, S.D., CLARK, M., WALDMANN, H. The generation of humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody wich retains in vitro immunosuppressive properties. **European Journal of Immunology** v.23, p.403-411, 1993.
- BRÜGGEMANN, M., OSBORN, M.J., MA, B., HAYRE, J., AVIS, S., LUNDSTROM, B., BUELOW, R. Human antibody production in transgenic animals. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** v. 63, p. 101-108, 2015.
- CHAISRI, U., CHAICUMPA, W. Evolution of therapeutic antibodies, influenza virus biology, influenza, and influenza immunotherapy. **BioMed Research International** v. 2018, 2018.
- CHANG, T.W., KUNG, P.C., GINGRAS, S.P., GOLDSTEIN, G. Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.78, n.3, p.1805-1808, 1981.
- CHATENOUD, L., BAUDRYHAYE, M.F., CHKOFF, N., KREIS, H., GOLDSTEIN, G., BACH, J.F. Restriction of the human *in vivo* immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. **The Journal of Immunology** v.137, p.830-838, 1986.
- CHATENOUD, L., THERVET, E., PRIMO, J., BACH, J.F. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. **Proceedings of the Nacional Academy of Science** v. 91, p. 123-127, 1994.
- ECKER, D., JONES, S.D., LEVINE, H.L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs** v.7, n. 1, p. 9-14, 2015.

ENLUND, E., FISCHER, S., HANDDRICK, R., OTTE, K., DEBATIN, K.M., WABITSCH, M., FISCHER-POSOVSZKY, P. Establishment of lipofection for studying miRNA function in human adipocytes. **PLOS ONE** v. 9, n. 5, 2014.

FERRARA, F., D'ANGELO, S., GAIOTTO, T., NARANJO, L., HONGZHAO, T., GRÄSLUND, S., DOBROVETSKY, E., HRABER, P., LUND-JOHANSEN, F., SARAGOZZA, S., SBLATTERO, D., KISSO, C., BRADBURY, A.R.M. Recombinant renewable polyclonal antibodies. **mAbs** v.7, n.1, p. 32-41, 2015.

FREITAS, V.J.F., SEROVA, I.A., ANDREEVA, L.E., DVORYANCHIKOV, G.A., LOPES-Jr., E.S., TEIXEIRA, D.I.A., DIAS, L.P.B., AVELAR, S.R.G., MOURA, R.R., MELO, L.M., PEREIRA, A.F., CAJAZEIRAS, J.B., ANDRADE, M.L.L., ALMEIDA.K.C., SOUSA, F.C., CARVALHO, A.C.C., SEROV, O.L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciência** v. 79, n. 4, p. 585-592, 2007.

FUNG, J.J., GORDON, M.R.D., ESQUIVEL, C.O., MAKOWKA, L., TZAKIS, A., STARZL, T.E. Impact of orthoclone OKT3 on liver transplantation. **Transplantation Proceedings** v. 19, p. 37-44, 1987.

FUNG, J., STARZL, T. Prophylactic use of OKT3 in liver transplantation. **Digestive Diseases and Science** v. 36, n. 10, p. 1427-1430, 1991.

GORDON, R.D., TZAKIS, A.G., IWATSUKI, S., TODO, S., ESQUIVEL, C.O., MARSH, J.W., STIEBER, A., MAKOWKA, L., STARZL, T.E. Experience with orthoclone OKT3 monoclonal antibody in liver transplantation. **American Journal of Kidney Disease** v. 11, n. 2, p. 141-144, 1988.

HEROLD, K.C., HAGOPIAN, W., AUGER, J.A., POUMIAN-RUIZ, E., TAYLOR, L., DONALDSON, D., GILTEMAN, S.E., HARLAN, D.M., XU, D., ZIVIN, R.A., BLUESTONE, J.A. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine** v.346, n. 22, p. 1692-1698, 2002.

HOOKS, M.A., WADE, C.S., MILLIKAN, J. Muromonab CD-3: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation. **Pharmacotherapy** v.11, n. 1, p. 26-37, 1991.

HOSONO, M., ENDO, K., SAKAHARA, H., WATANABE, Y., SAGA, T., NAKAI, T., KAWAI, C., MATSUMORI, A., YAMADA, T., KONISHI J. Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA). **Br. J. Cancer** v. 65, p. 197-200, 1992.

HSU, F.S., SU, C.H., HUANG, K.H. A comprehensive review of US FDA-Approved immune checkpoint inhibitors in urothelial carcinoma. **Journal of Immunology Research** v.2017, 2017.

INDO, Y., TATEMIZO, A., ABE, Y., SUZUKI, I., MATSUMOTO, K., HOSOI, Y., KINOSHITA, M., MIKAMI, K., MURATA, N., IRITANI, A., SAEKI, K.

Functional expression. Of humanized gene for an ω -3 fatty acid desaturase from scarlet flax in transfected bovine adipocytes and bovine embryos cloned from the cells. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1791, p. 183-190, 2009

INVITROGEN. **pBC1 milk expression vector kit: for the expression of recombinant proteins in the milk of transgenic mice**. Carlsbad: 2010, 43p.

JANEWAY, C.A.Jr., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M.J. **Immunobiology**. 5.ed. Nova York: Garland Science, 2001.

KIM, T.K., EBERWINE, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal. Bioanal. Chem.** V. 397, p. 3173-3178, 2010.

KIMBALL, J.A., NORMAN, D.J., SHIELD, C.F., SCHROEDER, T.J., LISI, P., GAROVOY, M., O'CONNELL, J.B., STUART, F., McDIARMID, S.V., WALL, W. The OKT3 antibody response study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. **Transplant Immunology** v.3, p.212-221, 1995.

KLING, J. First US approval for transgenic animal drug. **Nature Biotechnology** v. 27, p. 302-304, 2009.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** v. 256, 1975.

KUHN, C., WEINER, H.L. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. **Immunotherapy** v.8, n.8, p. 889-906, 2016.

KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., REINHERZ, E.L., SCHLOSSMAN, S.F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. **Science** v.206, p.347-349, 1979

LANDEGREN, U., RAMSTEDT, U., AXBERG, I., ULLBERG, M., JONDAL, M. WIGZELL H. Selective inhibition of human T cell cytotoxicity at levels of target recognition or initiation of lysis by monoclonal OKT3 and Leu-2a antibodies*. **The Journal of Experimental Medicine** v. 155, p. 1579-1584, 1982.

LEE, M.H., LIN, Y.S., TU, C.F., YEN, C.H. Recombinant human IX produced from transgenic porcine milk. **BioMed Research International** v. 2014, 2014

LI, F., VIJAYASANKARAN, N., SHEN, A.S., KISS, R., AMANULLAH, A. Cell culture process for monoclonal antibody production. **mAbs** v. 2, n. 5, p. 466-477, 2010.

LIPINSKI, D., ZEYLAND, J., SZALATA, M., PLAWSKI, A., JARMOUZ, M., JURA, J., KORCZ, A., SMORAG, Z., PIENKOWSKI, M., SLOMSKI, R. Expression of human growth hormone in the milk of transgenic rabbits with transgene mapped to the telomere region of chromosome 7q. **J Appl. Genetics** v. 53, p. 435-442, 2012.

LISAUSKAS, S.F.C. **Animais transgênicos utilizados como biorreatores**, 2008, 124f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília.

LOBUGLIO, A.F., WHEELER, R.H., TRANG, J., HAYNES, A., ROGERS, K., HARVEY, E.B., SUN, L., GHAYEB, J., KHAZAELI, M.B. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.86, p.4220-4224, 1989.

LU, F., LUO, C., LI, M., LIU, Q., WEI, Y., DENG, H., WANG, X., LI, X., JIANG, J., DENG, Y., SHI, D. Efficient generation of transgenic buffaloes (*Bufalus bubalis*) by nuclear transfer of fetal fibroblasts expressing enhanced green fluorescent protein. **Scientific Reports** v. 8, 2018.

MARANHÃO, A.Q., BRÍGIDO, M.M. Anticorpos humanizados. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, n. 23, p. 28-43, 2001.

MARCEAU, G., YANG, R., LAPIERRE, P., BÉLAND, K., ALVAREZ, F. Low-dose anti-CD3 antibody induces remission of active autoimmune hepatitis in xenoinmuneized mice. **Liver International** v. 35, n.1, p. 275-284, 2015.

MEDINA-ACOSTA, E., CROSS, G.A.M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molecular and Biochemical Parasitology** v. 59, p. 327-330, 1993.

MELO, E.O., SOUSA, R.V., IGUMA, L.T., FRANCO, M.M., RECH, E.L., RUMPF, R. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. **Genet. Mol. Res.** v. 4, n. 4, p. 812-821, 2005.

MELLOTT, A.J., GODSEY, M.E., SHINOGLE, H.E., MOORE, D.S., FORREST, M.L., DETAMORE, M.S. Improving viability and transfection efficiency with human umbilical cord Wharton's jelly cells through use of ROCK inhibitor. **Cellular Reprogramming** v.16, n. 2, 2014.

MENG, L., WAN, Y., SUN, Y., ZHANG, Y., WANG, Z., SONG, Y., WANG, F. Generation of five human lactoferrin transgenic cloned goats using fibroblasts cells and their methylation status of putative differential methylation regions of IGF2R and H19 imprinted genes. **PLoS ONE** v.8, n. 10, 2013.

MILLER, S.A., DYKES, D.D. AND POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** v.16, p.1215, 1988.

MORRISON, S.L., JOHNSON, M.J., HERZENBERG, L.A., OI, V.T. Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.81, p. 6851-6855, 1984.

NILSSON, P., PAAVILAINEN, L., LARSSON, K., ÖDLING, J., SUNDBERG, M., ANDERSSON, A.C., KAMPF, C., PERSSON, A., SZIGYARTO, C.A.K,

OTTOSSON, J., BJÖRLING, E., HOBER, S., WERNÉRUS, H., WESTER, K., PONTÉN, F., UHLEN, M. Towards a human proteome atlas: High throughput generation of mono-specific antibodies for tissue profiling. **Proteomics** v. 5, p. 4327-4337, 2005.

OLIVEIRA, R.R., CARVALHO, D.M., LISAIUSKAS, S., MELLO, E., VIANNA, G.R., DODE, M.A.N., RUMPF, R., ARAGÃO, F.J.L., RECH, E.L. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. **Genet. Mol. Res.** v. 4, n. 2, p. 185-196. 2005.

QIAN, X., KRAFT, J., NI, Y., ZHAO, F.Q. Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. **Scientific Reports** v. 4, 2014.

ROUTLEDGE, E.G., LLOYD, I., GORMAN, S.D., CLARK, M., WALDMANN, H. A humanized monovalent CD3 antibody which can activate homologous complement. **European Journal of Immunology** v.21, p.2717-2725, 1991.

SCHMIDT, C. Belated approval of first recombinant protein from animal. **Nature Biotechnology** v. 24, p. 877, 2006.

SCOTT, S.D. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Practice** v. 6, n.3, p. 195-197,1998.

SGRO, C. Side effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3 / Orthoclone OKT3: Bibliographic review. **Toxicology** v.105, p.23-29, 1995.

SHARMA, R.R., POLLOCK, K., HUBEL, A., McKENNA, D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion** v. 54, p. 1418-1437, 2014.

SHEEHAN, J., MARASCO, W.A. Phage and yeast display. **Microbiol Spectrum** v. 3, n. 1, 2015.

SHIM, G., KIM, M.G, PARK, J.Y., OH, Y.K. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 8, p. 72-80, 2013.

SILVA, C.G., MARTINS, C.F., CARDOSO, T.C., CUNHA, E.R., BESSLER, H.C., MARTINS, G.H.L., PIVATO, I., BÁO, S.N. Production of bovine embryos and calves cloned by nuclear transfer using mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adipose tissue. **Cellular Reprogramming** v. 18, p. 127-136, 2016a.

SILVA, C.G., MARTINS, C.F., CARDOSO, T.C., CUNHA, E.R., BESSLER, H.C., McMANUS, C.M., PIVATO, I., BÁO, S.N. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from bovine Wharton's jelly and their potential for use in cloning by nuclear transfer. **Ciência Rural** v. 46, n. 10, p. 1830-1837, 2016b

SILVA, H.M., VIEIRA, P.M.M.M., COSTA, P.L.N., PIMENTEL, B.M.S., MORO, A.M., KALIL, J., MARANHÃO, A.Q., COELHO, V., BRÍGIDO, M.M.

Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunology Letters** v.125, p.129-136, 2009.

SUSCOVICH, T.J., ALTER, G. In situ production of therapeutic monoclonal antibodies. **Expert Rev. Vaccines** v. 12, n. 2, p. 205-219, 2015.

VAISHAMPAYAN, U., THAKUR, A., RATHORE, R., KOUTTAB, N., LUM, L.G. Phase I Study of anti-CD3 x anti-Her2 Bispecific antibody in metastatic castrate resistant prostate cancer patients. **Prostate Cancer** v. 2015, ID. 285193, p. 1-10, 2015.

WANG, Y., ZHAO, S.BAI, L., FAN, J., LIU, E. Expression system and species used for transgenic animal bioreactors. **BioMed Research International** v. 2013, 2013.

WANG, Y.S., HE, X., DU, Y., SU, J., GAO, M., MA, Y., HUA, S., ZHANG, Y. Transgenic cattle produced by nuclear transfer of fetal fibroblasts carrying Ipr1 gene at a specific locus. **Theriogenology** v.84, p.608–616, 2015.

WU, X., OUYANG, H., DUAN, B., PANG, D., ZHANG, L., YUAN, T., XUE, L., NI, D., CHENG, L., DONG, S., WEI, Z., LI, L., YU, M., SUN, Q.Y., CHEN, D.Y., LAI, L., DAI, Y., LI, G.P. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. **Transgenic Res** v. 21, p. 537-543, 2012.

WU, X., LIN, Y., XI, Y., SHAO, Z., ZHOU, Y., LIU, F., CHEN, H. The development of transgenic mice for the expression of large amounts of lysozyme in milk. **Biotechnol Lett**, 2014.

YAGAMI, H., KATO, H., TSUMOTO, K., TOMITA, M. Monoclonal antibodies based on hybridoma technology. **Pharm. Pat. Analyst** v.2, n. 2, p. 249-263, 2013.

ZHU, X., NIE., J., QUAN, S., XU, H., YANG, X., LU, Y., LU, K., LU, S. In vitro production of cloned and transgenically cloned embryos from Guangxi Huanjiang Xiang pig. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal** v. 52, n. 2, p. 137-143, 2016.