

SBTE 214 CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

Uso de polietilenoimina e lipofectamine 2000 na transfecção de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro***T.D. Araújo¹; G.N. Quinelato²; M.M. Pereira³; L.S.A. Camargo⁴; J.H.M. Viana⁴**¹.CES/Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil; ².UNIPAC, Juiz de Fora, MG, Brasil; ³.EMBRAPA Gado de Leite e UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil; ⁴.EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.**Palavras-chave:** fibroblasto; transfecção; GFP.

O uso de células somáticas transgênicas como doadoras de núcleo para a técnica de transferência nuclear abriu diversas possibilidades na produção de animais geneticamente modificados. Contudo, a produção de linhagens celulares transgênicas ainda enfrenta dificuldades, incluindo o estabelecimento de métodos eficientes na entrega dos transgenes para as células doadoras de núcleos. Dentre as alternativas disponíveis estão o uso de lipídeos e polímeros catiônicos. Este estudo objetivou comparar as eficiências dos agentes LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e polietilenoimina (PEI; St. Lois, EUA) na transfecção de fibroblastos bovinos com DNA plasmidial (pDNA; pLL 3.7, Addgene, Cambridge, EUA) carreando o gene da proteína fluorescente verde (GFP). As células foram obtidas da orelha de vaca Gir com idade de sete anos e cultivadas a 37°C em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) acrescido de 10% SFB e antibiótico por duas passagens antes de serem congeladas em 10% DMSO. Após descongelação, o cultivo foi realizado em placas de quatro poços por aproximadamente 48h até a obtenção de 80% de confluência. Solução de complexos pDNA:carreador foi produzida em DMEM sem SFB (carreador LipofectamineTM) ou em solução de glicose a 5% (carreador PEI em solução com 18mM), ambos na proporção de 1µg de pDNA para 1µL do carreador (1 µg:1 µL de pDNA:agente carreador). A transfecção ocorreu por 5h em volume de 400 µL DMEM sem soro e antibiótico adicionado de 100 µL de solução com o complexo pDNA:carreador, totalizando 2 µg de pDNA em 500 µL de meio. O meio de cultivo foi totalmente trocado por DMEM acrescido de SFB e antibiótico ao final do período de transfecção. Os fibroblastos sofreram tripsinização após 48h e a partir da ressuspensão celular microgotas de 1µL foram submetidas à excitação em luz ultravioleta (450-490 nm) para a captura da fluorescência do GFP. A taxa de transfecção por microgota foi obtida pela razão de células fluorescentes/células totais. Para cada poço de cultivo foram contabilizadas as estruturas de três microgotas. Foram totalizadas duas repetições, cada uma com quatro replicatas por tratamento. Os dados foram submetidos à ANOVA. Os valores são mostrados como média±erro padrão da média. Maior proporção de células positivas para GFP (P<0,05) foi encontrada com a transfecção com LipofectamineTM (8,76±1,48%) do que com PEI (2,66±0,65%). Nas condições desse estudo, a LipofectamineTM foi mais eficiente para transfecção de fibroblastos bovinos na proporção pDNA: carreador testada. Contudo, estudos são necessários para confirmar tal resultado, incluindo diferentes proporções de pDNA:carreador e tipos celulares.

Apoio financeiro: FAPEMIG.