

NANOSMGT: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS TRANSGÊNICOS UTILIZANDO NANOESTRUTURAS

REIS, Filipe Barbosa^{1*}; CAMPOS, Vinicius Farias¹; LEON, Priscila Marques Moura de¹; KOMNINOU, Eliza Rossi¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling¹; COLLARES, Tiago^{1}**

¹Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

*reis.filipeb@gmail.com

**collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT) tem sido aplicada para a produção de animais transgênicos em várias espécies que usam o espermatozoide para reprodução (SPADAFORA, 2007). Esta técnica pode se tornar a maneira mais eficiente e barata para a geração de animais transgênicos, o que aumentará significativamente sua aplicação para pesquisa biomédica e para produção comercial, entretanto, sua eficiência ainda precisa ser melhorada (KANG et al., 2008).

Em particular, uma das principais causas da baixa eficiência da técnica está relacionada à baixa captação de DNA exógeno pelo espermatozoide e a sua subsequente degradação pelas enzimas DNases destas células (CAMPOS et al., 2011a). Com o objetivo de incrementar a eficiência desta técnica de geração de animais transgênicos, diferentes processos de transfecção já foram testados como eletroporação, incubação e lipofecção (SHEMESH et al., 2000; HOELKER et al., 2007), entretanto, as taxas de embriões transgênicos ainda são baixas.

Recentemente, nós demonstramos que a utilização de nanopolímero catiônico incrementa a transfecção de DNA exógeno para espermatozoides bovinos (CAMPOS et al., 2011c) em uma técnica que denominamos de NanoSMGT.

Outras nanoestruturas também apresentam potencial para a transfecção em espermatozoides. Tem sido sugerido que os nanotubos de haloisita (HCNs) podem ser utilizados para a transfecção de DNA em células eucarióticas. HCNs são um nanomaterial formado naturalmente com depósitos em vários países como os EUA e no Brasil. Os nanotubos de haloisita são biocompatíveis e espontaneamente incorporados pelas células.

Baseado em nossos resultados anteriores, demonstrando que NanoSMGT pode ser uma técnica eficaz para a introdução de DNA exógeno em espermatozoides de bovinos (CAMPOS et al. 2011c), o nosso objetivo no presente estudo foi de avaliar a transmissão do transgene de embriões bovinos através NanoSMGT, usando HCNs como agente de transfecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho experimental

Amostras de sêmen foram transfectadas utilizando quatro diferentes métodos: incubação com DNA puro, lipofecção, transfecção utilizando nanopolímero catiônico (Nanofect) e transfecção usando nanotubos de haloisita

(CAMPOS et al., 2011b). Como controle, amostras de sêmen não transfectadas foram utilizadas na fertilização *in vitro* (FIV). O sêmen tratado e não tratado foi utilizado para fertilização *in vitro* de oócitos bovinos. As taxas de clivagem e de blastocisto foram avaliadas para determinar se os transfectantes afetaram o desenvolvimento embrionário. A análise de PCR foi conduzida para detectar se o transgene foi transmitido para os embriões. Embriões no estágio de quatro células foram usados para a quantificação do número de plasmídeos transmitidos para os embriões por real-time PCR e a expressão do transgene foi avaliada por microscopia de fluorescência. Todos os procedimentos experimentais foram repetidos pelo menos três vezes.

2.2. Fertilização *in vitro*

Os ovários foram obtidos a partir de um abatedouro local. Complexos Cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos. Todos os ovócitos com citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do cumulus intactas foram selecionadas para maturação *in vitro* (MIV). Grupo de COCs (máximo 20) foram maturados em gotas de 90 μ L do mesmo meio, sob óleo mineral a 38.5 °C, 5% CO₂ no ar, com umidade máxima por 22-24 h. COCs foram lavadas três vezes em meio de fertilização TALP com 25 mM HEPES, em seguida, os oócitos foram transferidos em grupos de até 25 para cada gota de FIV. As amostras de sêmen transfectas e não transfectadas foram utilizadas para a FIV. Zigotos rodeados por algumas camadas de células granulosas foram então transferidos para placas com gotas de 100 μ L de meio e cultivadas por 7 dias no meio de cultura SOF a uma temperatura de 38.5 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ no ar com umidade máxima.

2.3. Avaliação dos embriões

Durante o cultivo, os embriões foram avaliados diariamente para o estágio morfológico de desenvolvimento até o dia 7 de cultivo (D7). Foram considerados clivados embriões com 2-8 células, mórulas com 8-16 células e blastocistos. Além disso, os embriões foram avaliados quanto a presença do vetor pEGFP-N1 análise de PCR, quantificação dos plasmídeos transmitidos por qPCR e expressão do transgene por microscopia de fluorescência.

2.4. Avaliação do transgene

Os embriões foram lavados em PBS e em seguida transferidos para digestão da zona pelúcida em pronase. Em seguida, os embriões foram lavados em PBS e em seguida estocados em nitrogênio líquido até o uso. Para aumentar a eficiência da PCR os embriões serão digeridos com proteinase K. O produto da digestão foi usado como *template* para duas reações de PCR, uma com primers específicos para o vetor pEGFP-N1 (CAMPOS et al., 2011c) outra específica para a região satélite 1.715 do genoma bovino. (NEDAMBALE et al., 2004). A quantificação dos plasmídeos transmitidos para embriões de quatro células por PCR em tempo real foi realizada como descrito previamente (HOELKER et al., 2007; CAMPOS et al., 2011b). Todos os embriões clivados foram avaliados quanto à expressão do transgene por microscopia de fluorescência.

2.5. Análise dos dados.

As taxas de embriões clivados, blastocistos, PCR positivos foram comparadas usando teste chi-quadrado. O número de plasmídeos transmitidos para os embriões de 4 células foi comparado através de ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de formação de blastocisto foi semelhante entre os tratamentos, além disso, houve um aumento na taxa de clivagem quando os HCNs foram utilizados (Tabela 1). Taxas de PCR positivo para o transgene foram de 8.1, 10.2, 45.6 e 40.7% de DNA puro, lipossomos, Nanofect e HCNs respectivamente. A proporção de embriões carregando o transgene foi maior ($P < 0.05$) nos fertilizados com o sêmen transfectado com Nanofect ou NCHs em comparação com os fertilizados com o sêmen transfectado com DNA exógeno puro ou lipossomos (Tabela 1).

Concomitante com estes resultados houve um aumento ($P < 0.05$) no número de plasmídeos transmitidos para oócitos quando foram fertilizados com sêmen transfectado com Nanofect ou HCNs, em comparação a grupos fertilizados com o sêmen transfectado com DNA exógeno puro ou lipossomos. Nenhuma cópia do plasmídeo foi detectada nos embriões controles derivados a partir de fertilização com sêmen não-transfectados. Nenhum dos embriões expressou a EGFP.

Em nosso estudo anterior, o sêmen bovino foi transfectado de forma eficiente utilizando nanopolímero catiônico (CAMPOS et al. 2011c). O presente estudo corrobora com este resultado, já que nanocompósitos melhoram a transmissão do transgene para embriões de bovinos, sem efeitos adversos sobre no desenvolvimento *in vitro* de embriões.

Tabela 1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões de oócitos bovinos fecundados *in vitro* com o esperma submetidas a procedimentos de transfecção vários

Sistema de transfecção de espermatozoides	Oócitos	*Clivadas (%)	*Blastocistos (%)	† PCR positivo (%)
Controle	59	36 (61) ^a	11 (18.6)	0 ^a
DNA exógeno puro	60	37 (61) ^a	12 (20)	3 (8.1) ^b
Limpofectamine 2000	59	39 (66) ^a	13 (22)	4 (10.2) ^b
NanoFect	73	57 (78) ^a	22 (30.1)	26 (45.6) ^c
Nanotubos de argila haloisita	64	54 (84) ^b	15 (23.4)	22 (40.7) ^c

* Taxas de clivagem e formação de blastocisto são expressos como uma porcentagem do número inicial de ovócitos.

† Taxas de positividade do PCR são expressos como uma porcentagem do número de embriões clivados.

a-c Dentro de uma coluna, as taxas sem sobrescrito comum diferiram ($P < 0.05$).

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que tanto os nanotubos de haloisita quanto o nanopolímero catiônico incrementam a transmissão do transgene para embriões bovinos sem nenhum efeito deletério ao desenvolvimento embrionário demonstrando que a NanoSMGT pode incrementar a produção de embriões bovinos transgênicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPOS, V.F.; AMARAL, M.G.; SEIXAS, F.K.; POUHEY, J.L.; SELAU, L.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T.. Exogenous DNA uptake by South American catfish (*Rhamdia quelen*) spermatozoa after seminal plasma removal. **Animal Reproduction Science**; v. 126, p. 136-141, 2011a.

CAMPOS, V.F.; DE LEON, P.M.; KOMNINO, E.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; DESCHAMPS, J.C.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.. NanoSMGT: transgene transmission into bovine embryos using halloysite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. **Theriogenology**; 2011b.

CAMPOS, V.F.; KOMNINO, E.R.; URTIAGA, G.; DE LEON, P.M.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T.. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. **Theriogenology**; v. 75, p. 1476-1481, 2011c.

HOELKER, M., MEKCHAY, S., SCHNEIDER, H., et al. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: effect of transfection reagent and DNA architecture. **Theriogenology**; 67:1097–107, 2007.

KANG, J.H., HAKIMOV, H., RUIZ, A., FRIENDSHIP, R.M., BUHR, M., GOLOVAN, S.P.: The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. **Theriogenology**, v.70, p.1288-1296, 2008.

MILAZZOTTO, M.P., GOISSIS, M.D., FEITOSA, W.B., et al. Myostatin gene knockdown through lentiviral-mediated delivery of shRNA for in vitro production of transgenic bovine embryos. **Zygote**, 18:339–44, 2010.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYES, A.; YANG, X.; TIAN, X.C.. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1671-1676, 2004.

SHEMESH, M., GUREVICH, M., HAREL-MARKOWITZ, E., BENVENISTI, L., SHORE, L.S., STRAM, Y. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. **Molecular Reproduction and Development**, v.56, p.306-308, 2000.

SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: mechanisms and implications. **Society for Reproduction and Fertility Suppl**, v.65, p.459-467, 2007.

ZHANG, Y., LUO, J., Bi, J., et al. Efficient separation of homologous alpha-lactalbumin from transgenic bovine milk using optimized hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.3668 –73, 2010.