

NANOSMGT: TRANSFEÇÃO DE DNA EXÓGENO EM SÊMEN BOVINO SEXADO USANDO NANOPOLÍMEROS

CAMPOS, Vinicius Farias*, URTIAGA, Gabriel, KOMNINOU, Eliza Rossi, LEON, Priscila Moura de; SEIXAS, Fabiana Kömmling, DESCHAMPS, João Carlos

COLLARES, Tiago

Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas *fariascampos@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).

Diversos estudos têm reportado estratégias para melhorar a incorporação do DNA exógeno pelas células espermáticas como a eletroporação, lipofecção, bem como complexos DMSO/DNA (Collares et al., 2010). Embora, a geração de progênes transgênicas ainda é baixa. Entretanto, como recentemente demonstrado por Kim et al. (2009), o uso de nanopartículas magnéticas para a introdução de DNA exógeno nos espermatozoides poderá incrementar a produção de embriões transgênicos.

A SMGT tem sido amplamente usada para a produção de embriões bovinos transgênicos (Shemesh et al., 2000; Hoelker et al., 2007). No entanto, dependendo da aplicação destes animais a seleção do sexo do embrião torna-se necessária. O sêmen sexado bovino tem sido comercializado e usado com sucesso para a produção de embriões com sexo desejado evitando os problemas causados pela biópsia embrionária (Seidel, Jr., 2003). Atualmente, diversas companhias vêm oferecendo sêmen bovino sexado em diversos países a custos relativamente baixos. Recentemente, (De Cecco et al., 2010) demonstraram a possibilidade o uso do sêmen sexado associado à SMGT para a produção de embriões suínos transgênicos.

No presente estudo é demonstrado, pela primeira vez, a capacidade de incorporação de DNA exógeno por espermatozoides bovinos sexados comercialmente disponíveis usando nanopolímero como transfectante, um método denominado como NanoSMGT.

2. METODOLOGIA

2.1. Origem dos espermatozoides

O sêmen comercial sexado macho e fêmea e o não sexado foram obtidos de três touros da raça nelore (CRV Lagoa, São Paulo, Brasil).

2.2. Nanotransfecção dos espermatozoides

Amostras de sêmen de cada macho foram descongeladas para confecção do pool. O vetor pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA) foi associado com ao nanotransfectante *NanoFect Transfection Reagent* (Quiagen[®], USA) de acordo com as introduções do fabricante e em seguida incubados com espermatozoides (1×10^6 células) por 60 minutos a 38.5 °C e 5% (v/v) CO². Após a incubação os espermatozoides foram lavados 3 vezes em PBS e logo após tratados com 20 U de DNase I (Invitrogen[®], USA) para remover o DNA não internalizado pelas células. Após o tratamento com DNase as células foram lavadas novamente em PBS e submetidas à extração de DNA usando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen[®], USA).

2.3. Motilidade e Viabilidade Espermática

A motilidade foi avaliada em microscopia óptica de contraste de fases e a viabilidade foi avaliada usando o kit LIVE/DEAD[®] Sperm Viability (Invitrogen[®], USA) seguindo as instruções do fabricante.

2.4. Quantificação da internalização do DNA exógeno por PCR em tempo real

Foram utilizadas reações de PCR em tempo real para a quantificação do vetor pEGFP utilizando como template o DNA extraído dos espermatozoides. Reações foram conduzidas no sistema Stratagene[®] Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies[®], UK) usando o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen[®], Carlsbad, USA) e os primers para o vetor pEGFP (for 5' CACGTCATTTTCCTCCTGCAT 3', rev 5' GCATAGCGGCTCGTAGAGGTA 3'). Para a quantificação, uma curva padrão foi gerada usando diluições seriadas do plasmídeo (10^2 to 10^7 cópias). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

2.5. Desenho experimental

Este experimento objetivou investigar a habilidade na incorporação do DNA exógeno por espermatozoides bovinos sexados após a transfecção usando nanopolímeros. O sêmen sexado e não sexado foram incubados com três diferentes proporções de DNA exógeno: a) linear:circular; b) apenas linear (L), c) linear e circular (1:1, L:C) e d) apenas circular numa concentração total de 10 ug. O vetor linear foi digerido com a enzima *NotI*. A motilidade e a viabilidade espermática foram avaliadas antes e depois da incubação seguido pela quantificação do DNA exógeno incorporado pelas células. Este experimento foi repetido três vezes usando pools separados de sêmen congelado.

2.6. Análise dos dados

Os dados de motilidade e a viabilidade espermática foram comparados usando teste de *t*. Os dados de quantificação do DNA exógeno foram comparados através de ANOVA seguido por teste de Tukey. O nível de significância foi considerado em $p < 0.05$. Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espermatozoides bovinos sexados foram capazes de internalizar o DNA exógeno. Também, foi observado que tanto o sêmen macho quanto o fêmea incorporaram menos DNA que os espermatozoides não sexados.

Entretanto, no sêmen fêmea tratado com DNA circular (C) e no macho tratado com DNA linear e circular (L:C) foram observados níveis similares de incorporação do vetor (Figura 1a). A motilidade e a viabilidade espermática não foram afetadas pelo DNA exógeno (Figura 1b, 1c).

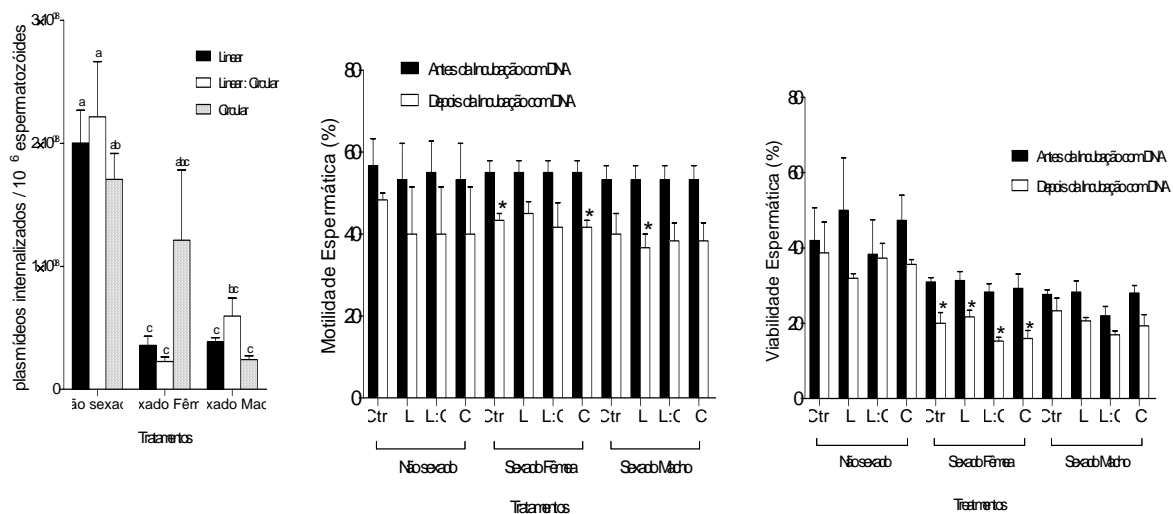


Figura 1. Nanotransfecção em sêmen sexado. a) Quantificação da internalização do DNA exógeno através do PCR quantitativo usando diferentes taxas de DNA linear:circular. Diferentes letras indicam diferenças significativas. b) Motilidade espermática antes e após a incubação com DNA. c) Viabilidade espermática antes e após a incubação com DNA. O asterisco indica diferença significativa. Dados são expressos como média \pm EPM (n = 3).

Estes resultados corroboram com o uso de nanopartículas magnéticas para promover a introdução de DNA exógeno em espermatozoides suínos e seu subsequente uso para geração de embriões transgênicos (Kim et al., 2009) e com os dados obtidos por De Cecco et al. (2010) que utilizaram sêmen sexado para a geração de embriões bovinos transgênicos.

Interessantemente, foi observado que em alguns casos, a captação de DNA exógeno pelos espermatozoides é menor do que naqueles não sexados. No entanto, este fato provavelmente não interferirá na produção de embriões bovinos transgênicos com sexo selecionado através da NanoSMGT, uma vez que, estudos anteriores demonstraram a produção de embriões transgênicos com espermatozoides que capturaram pequenas quantidades de DNA exógeno (Lavitrano et al., 2006).

Este protocolo de nanotransfecção não altera a motilidade e a viabilidade espermática dos espermatozoides tratados, demonstrando que o potencial para fertilização não é afetado pelo DNA exógeno e pelo nanotransfectante.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho é demonstrado pela primeira vez o uso de um nanopolímero para a introdução de DNA exógeno em espermatozoides bovinos sexados sem a perda da motilidade e da viabilidade espermática demonstrando que a NanoSMGT pode ser usada para a produção de embriões bovinos transgênicos com sexo selecionado.

5. REFERÊNCIAS

COLLARES, T., CAMPOS, V.F., SEIXAS, F.K., CAVALCANTI, P.V., DELLAGOSTIN, O.A., MOREIRA, H.L., DESCHAMPS, J.C. Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. **Journal of Biosciences**, v. 35, p. 39-47, 2010.

DE CECCO, C.M., SPINACI, M., ZANNONI, A., BERNARDINI, C., FORNI, M., BACCI, M.L. Coupling sperm mediated gene transfer and sperm sorting techniques: a new perspective for swine transgenesis. **Theriogenology**, v. 74, p. 856-862, 2010.

HOELKER, M., MEKCHAY, S., SCHNEIDER, H., BRACKET, B.G., TESFAYE, D., JENNEN, D., THOLEN, E., GILLES, M., RINGS, F., GRIESE, J., SCHELLANDER, K. 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**, v. 67, p. 1097-1107, 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.

KIM, T.S., LEE, S.H., GANG, G.T., LEE, Y.S., KIM, S.U., KOO, D.B., SHIN, M.Y., PARK, C.K., LEE, D.S. Exogenous DNA Uptake of Boar Spermatozoa by a Magnetic Nanoparticle Vector System. **Reproduction in Domestic Animals**, 2009.

LAVITRANO, M., BUSNELLI, M., CERRITO, M.G., GIOVANNONI, R., MANZINI, S., VARGIOLU, A. Sperm-mediated gene transfer. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 19-23, 2006.

SEIDEL, G.E., Jr. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, v. 59, p. 585-598, 2003.

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. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl**, v. 65, p. 459-467, 2007.