

Efeitos da transfecção com dendrímero catiônico sobre parâmetros de qualidade espermática em bovinos

WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; MARIANA HÄRTER REMIÃO^{1,2}; CAROLINE GOMES LUCAS^{1,2}; NATHANIELE NEBEL BARTHER¹; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA^{1,2}; VINICIUS FARIAS CAMPOS^{1,2}

¹Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
williamwwe@yahoo.com.br

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A produção de animais transgênicos é uma das ferramentas biotecnológicas que mais cresce no meio científico. Avanços nessa área nos últimos anos fizeram com que ela exercesse atualmente um papel bastante importante em várias áreas como na produção animal, propiciando uma melhora na qualidade genética e aumento em número da produção (SALAMONE et al., 2012); no estudo de diversas doenças, principalmente doenças humanas, uma vez que os animais transgênicos podem mimetizar distúrbios de saúde e, assim, permitem a avaliação de novos fármacos (PETTERS; SOMMER, 2000), dentre outras aplicações.

Deste modo, frente à vasta aplicabilidade da transgênese animal, diversas técnicas têm sido testadas para serem utilizadas na geração de animais transgênicos. Dentre essas técnicas, uma que se destaca é a transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT), pois é uma técnica considerada simples e de baixo custo (CAMPOS et al., 2011a; EGHBALSAIED et al., 2013).

Embora animais transgênicos já tenham sido gerados pela SMGT, a transfecção (internalização) limitada de DNA exógeno nos espermatozoides e sua degradação posterior por DNases presentes tanto no plasma seminal quanto no citoplasma continuam a ser os principais fatores subjacentes à baixa eficiência desta técnica (CAMPOS et al., 2011a; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2009). Por isso, várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar a captação de DNA exógeno (COLLARES et al., 2010; HOELKER et al., 2007), porém a frequência da prole transgênica ainda é baixa.

Já utilizados na transfecção de uma grande variedade de células cultivadas *in vitro* (YAO et al., 2009), nanopolímeros sintéticos altamente ramificados, conhecidos como dendrímeros catiônicos, trouxeram novas perspectivas para a produção de embriões transgênicos através da técnica de SMGT. A presença de grupos aminos carregados positivamente na superfície destes dendrímeros (MARVANIYA et al., 2010), poderá facilitar a ligação e posterior liberação do DNA exógeno no interior das células espermáticas.

Deste modo, procurando otimizar a transfecção em sêmen bovino, se faz necessária a realização de ensaios utilizando dendrímeros catiônicos para avaliar os efeitos da transfecção sobre a motilidade e viabilidade espermática.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo do sêmen e do DNA exógeno

O sêmen bovino foi comprado de três machos da raça Nelore (CRV Lagoa Ltda., SP). As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos e centrifugadas duas vezes para confecção de um pool para cada processo de transfecção. A concentração espermática foi ajustada para 1×10^6 células/200µl de meio Opti-MEM (Invitrogen, USA).

O DNA exógeno utilizado neste trabalho foi o plasmídeo comercial pEGFP (GenBank #U55762) na concentração de 10µg (CAMPOS et al., 2011b).

2.2 Processo de transfecção

Para padronizar um método de transfecção com dendrímero catiônico em sêmen bovino, foi utilizado o reagente comercial de transfecção PolyFect® (QIAGEN, USA), onde foram testadas diferentes concentrações do mesmo.

Duas soluções foram preparadas: Solução A: 10µg de DNA exógeno; e Solução B: 30, 60 ou 120µg de reagente de transfecção PolyFect®. Seguindo as instruções do fabricante, as soluções A e B foram misturadas e incubadas em eppendorfs durante 10min à temperatura ambiente, permitindo a formação de complexos DNA exógeno-dendrímero.

Em outro grupo, utilizou-se o reagente de transfecção na maior concentração (120µg) sem a adição do DNA exógeno. Além dos grupos experimentais citados acima, foi adicionado um grupo controle onde não foi realizada a transfecção.

Após, as soluções contendo os complexos DNA exógeno-dendrímero e somente dendrímero, nas diferentes concentrações, foram adicionadas ao pool de espermatozoides (1×10^6 células) em um volume total de 200µl, seguido por um período de incubação de 1 hora a 38.5°C.

2.3 Avaliação da motilidade espermática e viabilidade celular

A motilidade espermática foi avaliada visualmente em 4 campos com aproximadamente 100 espermatozoides em cada, sob microscopia de contraste de fase. Esta variável é expressa como a percentagem média de espermatozoides com movimento linear em cada campo.

Já o ensaio de viabilidade espermática foi realizado utilizando o kit LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen®, USA) seguindo as instruções do fabricante. O número de células vermelhas (mortas) e células verdes (vivas) em um total de 100 espermatozoides por tratamento foi contabilizado em triplicata, sob um microscópio de fluorescência. O resultado dessa avaliação foi expresso como a percentagem média de espermatozoides viáveis.

Ambas as avaliações foram realizadas antes e imediatamente após a transfecção, sendo realizadas em triplicata e contabilizadas de forma independente por três pessoas.

2.4 Análise de dados

A motilidade e a viabilidade espermática, antes e após os processos de transfecção, foram comparadas usando teste t. Foram considerados valores significantes de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da visualização em microscópio óptico foi possível analisar a motilidade espermática, antes e depois da transfecção, em todos os grupos (Figura 1A).

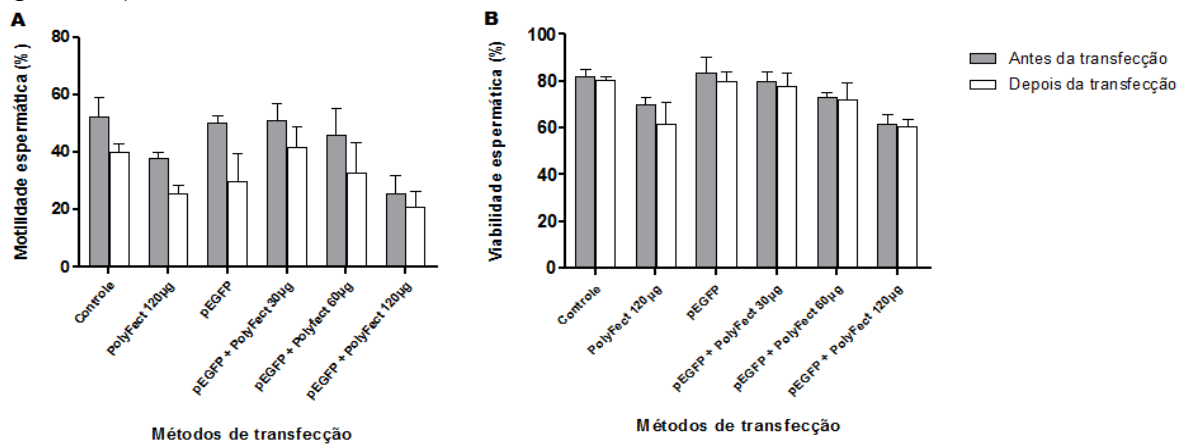


Figura 1 – A) Gráfico da motilidade espermática antes e após o processo de transfecção utilizando reagente de transfecção PolyFect® em diferentes concentrações. B) Gráfico da viabilidade espermática antes e após o processo de transfecção utilizando reagente de transfecção PolyFect® em diferentes concentrações. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

Após 1 hora de incubação, não foi observada diminuição significativa ($P < 0,05$) da motilidade dos espermatozoides nos grupos experimentais, incluindo os transfectados somente com DNA exógeno (plasmídeo pEGFP) ou em conjunto com o reagente de transfecção que consiste de dendrímeros catiônicos (PolyFect®) nas diferentes concentrações.

Anzar e Buhr (2006) citam que a diminuição acentuada da motilidade de espermatozoides transfectados pode ser devido à ativação de DNases, que causam a clivagem do DNA exógeno e que está associada com a posterior morte celular (apoptose). Nossos resultados se mostraram satisfatórios, uma vez que em nosso estudo foi utilizado dendrímero catiônico como carreador do DNA exógeno para o interior das células espermáticas, os quais acabam tamponando o pH do citoplasma e consequentemente levam à inibição da ação de DNases.

Quanto à viabilidade espermática, analisada através de microscopia de fluorescência, não houve diminuição ($P < 0,05$) do número de células espermáticas viáveis (sem danos na membrana celular) após a transfecção em todos os grupos (Figura 1B). Marvaniya et al. (2010) acreditam que o processo de internalização de dendrímeros catiônicos por células, se dá primeiramente por atração eletrostática seguida por endocitose, sem que ocorra a ruptura ou dano acentuado à membrana celular.

4. CONCLUSÕES

O processo de transfecção com dendrímero catiônico não altera a motilidade e a viabilidade espermática, mesmo quando utilizada a maior concentração de transfectante. Porém, novas avaliações são necessárias a fim de quantificar a internalização de DNA exógeno nas células espermáticas para comprovar a eficiência da técnica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAR, M.; BUHR, M. M. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 65, p. 683-690, 2006.

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

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.

EGHBALSAIED, S.; GHAEDI, K.; LAIBLE, G.; HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; OBACK, F.; NASR-ESFAHANI, M. H.; OBACK, B. Exposure to DNA is insufficient for in vitro transgenesis of live bovine sperm and embryos. **Reproduction**, v. 145, n. 1, p. 97-108, 2013.

GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GARCIA-ROSELLO, E.; GUTIERREZ-ADAN, A.; GADEA, J. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 506-518, 2009.

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, n. 6, p. 1097-1107, 2007.

MARVANIYA, H. M.; PARIKH, P. K.; PATEL, V. R.; MODI, K. N.; SEN, D. J. Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, p. 97-108, 2010.

PETTERS, R. M.; SOMMER, J. R. Transgenic animals as models for human disease. **Transgenic Research**, v. 9, n. 4, p. 347-351, 2000.

SALAMONE, D.; BEVACQUA, R.; HIRIART, M. I.; BUEMO, C.; LUCHETTI, C.; MORO, L.; FERNANDEZ-MARTIN, R. Transgenesis in farm animals. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 772-776, 2012.

YAO, H.; NG S. S.; TUCKER, W. O.; TSANG, Y. K.; MAN, K.; WANG, X M.; CHOW, B. K.; KUNG, H. F.; TANG, G. P.; LIN, M. C. The gene transfection efficiency of a folate-PEI600-cyclodextrin nanopolymer. **Biomaterials**, v. 30, p. 5793– 5803, 2009.