

NANOSMGT: TRANSFEÇÃO DE DNA EXÓGENO EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS UTILIZANDO NANOTUBOS DE HALOISITA

URTIAGA, Gabriel^{1*}; CAMPOS, Vinicius Farias¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling², COLLARES, Tiago¹; DESCHAMPS, João Carlos¹

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

²Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

*gabrielurtiaga@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 30 anos, muitos estudos buscaram desenvolver métodos eficientes para geração de animais transgênicos (Wall, 2002). Os mais comumente utilizados são a microinjeção de pronúcleos, a transferência nuclear de célula somática, o uso de vetores virais e, mais recentemente, a transgênese de células tronco embrionárias.

O uso de sêmen para a transgênese tem sido estudado e diversas abordagens neste sentido vêm sendo desenvolvidas, entretanto a eficiência das técnicas de transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT) ainda necessita ser incrementada (Kang et al., 2008; Collares et al., 2010). A limitada captação de DNA exógeno pelo espermatozoide e sua degradação por enzimas seminais (principalmente DNases do plasma seminal), despontam como principais responsáveis por essa insatisfatória eficiência da técnica (Lanes et al., 2009). Muitas estratégias têm sido utilizadas a fim de incrementar a captação de DNA, como o uso de eletroporação, lipofecção e complexos DNA/DMSO, entretanto a geração de progênes transgênicas ainda é baixa (Spadafora et al., 2007; Campos et al., 2011).

Mais recentemente, o uso da nanotecnologia no contexto do SMGT abriu novas possibilidades para a entrega eficiente de DNA exógeno em espermatozoides. Kim et al. (2010) obteve altas taxas de transgenie para embriões suínos produzidos in vitro a partir da transfeção de DNA com nanopartículas magnéticas. Nosso grupo demonstrou, com sucesso, a utilização de nanoplímero como agente transfectante de DNA exógeno para espermatozoides bovinos, introduzindo o conceito de NanoSMGT (Campos et al., 2011).

Compartimentos funcionais de escalas nanométricas têm sido utilizados com sucesso para entrega de fármacos e ácidos nucleicos em células e tecidos animais. Neste sentido, o nanotubo de haloisita (HCN's) é particularmente interessante, pois é um nanomaterial natural, com depósitos em diversos países, inclusive no Brasil (Levis et al., 2002). HCN's são biocompatíveis e espontaneamente incorporado por células (Vergaro et al., 2010). Essas características fazem desse material um potencial agente transfectante para uso em SMGT bovino.

O objetivo deste trabalho foi comparar a taxa de captação de DNA exógeno por espermatozoides bovinos submetidos a quatro tratamentos de transfeção diferentes: DNA livre no meio, lipofecção, transfeção por nanopolímero e transfeção por HCN.

2 METODOLOGIA

Origem do esperma

Sêmen de três touros da raça Nelore foram adquiridos da CRV Lagoa Ltda. (São Paulo, Brasil).

Procedimentos de transfecção no sêmen

Uma palheta de cada touro foi descongelada para confecção do pool. Para todos os procedimentos de transfecção, o plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA) foi utilizado na quantidade de 10µg em uma taxa 1:1 (linear:circular), sendo este o melhor arranjo para absorção do DNA pelos espermatozoides bovinos (Campos et al., 2011). A linearização do DNA foi realizada pela enzima de restrição *NotI* e o plasmídeo foi purificado com GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare[®], Buckinghamshire, UK). Todas as transfecções foram realizadas com o mesmo pool de espermatozoides (1×10^6). Quatro tratamentos foram testados para transfecção do DNA nos espermatozoides: 1) DNA livre puro, 2) lipofecção usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen[®], USA), 3) transfecção usando nanopolímero (NanoFect Transfection Reagent, Qiagen, Canada) e 4) transfecção por associação a nanotubos de haloisita (HCNs; Sigma-Aldrich, USA).

Análises de 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.

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 (102 to 107 cópias). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

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 DISCUSSÃO

Não foram encontradas diferenças nos níveis de motilidade e viabilidade espermática antes e depois dos tratamentos, demonstrando que os procedimentos de transfecção não afetam esses parâmetros (Fig. 1a). Por outro lado, o número de plasmídeos internalizados pelas células espermáticas foi superior pela utilização de HCN's em comparação a lipofecção ou uso de DNA livre. Nanofect foi o transfectante mais efetivo ($P=0.05$) (Fig. 1b).

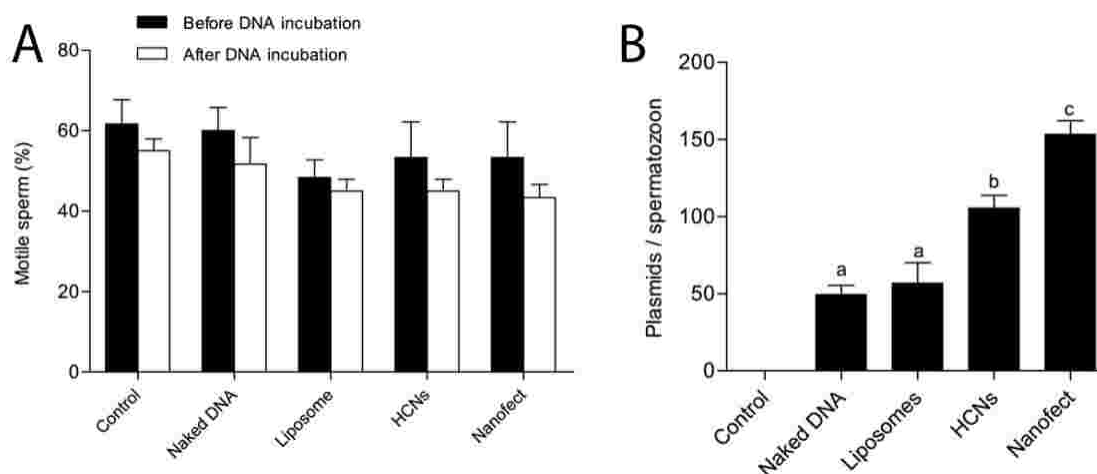


Figura 1. Em (A): Motilidade espermática antes e depois do procedimento de transfecção. Em (B): Quantificação de DNA exógeno dos espermatozoides bovinos por real-time PCR.

Nossos estudos anteriores demonstraram a eficiência do nanopolímero catiônico para transfecção de DNA em espermatozoides bovinos (Campo et al., 2011). O presente estudo corroborou com esse resultado; a absorção de DNA exógeno pelo espermatozóide foi incrementada pela utilização de HCN's ou nanopolímeros em comparação à lipofecção ou incubação com DNA livre. Outros estudos já haviam relatado a capacidade transfectante de lipossomas (Bachiller et al., 1991), entretanto, aparentemente, este é o primeiro estudo que utiliza HCN's para essa finalidade. Kim et al (2010) já haviam demonstrado a produção com sucesso de embriões suínos usando nanopartículas magnéticas para a introdução de DNA exógeno, porém o estudo deles não incluiu a comparação desse método de transfecção com outros.

A transfecção por lipofecção transporta o plasmídeo via endocitose e o tráfego até o núcleo se dá pela via endossomal ou lisossomal, as quais provocam muitas perdas de transgene por nucleases. De mesma forma, utilizando DNA livre obtemos grandes perdas em função do elevado número de DNases presentes no sêmen (Lanes et al., 2009; Collares et al., 2010;). Kim et al (2010) demonstraram que, quando usados lipossomos, a DNase I reduz a taxa de DNA exógeno ligante a espermatozoides, entretanto o uso de nanopartículas magnéticas essa redução foi significativamente menor.

Vários nanopolímeros catiônicos desempenham com considerável eficiência a transfecção in vivo e in vitro (Yoa et al., 2009). Geralmente, esses agentes apresentam muitas aminas primárias que formam políplexos com DNA negativos, facilitando a entrada e liberação do DNA exógeno no citosol (Fischer et al., 1999). Além disso, estudos anteriores demonstraram que nanotubos apresentam a capacidade de proteger a molécula de DNA (inclusive proteínas ligadas a ela) de clivagens enzimáticas, durante e depois da entrega para as células (Wu et al., 2008).

4. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a utilização de HCN's ou nanopartículas Nanofect incrementa a entrega de DNA exógeno em espermatozoides bovinos quando comparado à utilização de lipossomos ou DNA livre.

5 REFERÊNCIAS

BACHILLER D, SCHELLANDER K, PELI J, RUTHER U. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.30, p.194–200, 1991.

CAMPOS VF, KOMNINOUE ER, URTIAGA G, DE LEON PM, SEIXAS FK, DELLAGOSTIN OA, DESCHAMPS JC, COLLARES T. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. **Theriogenology**, v.75, p.1476–1481, 2011.

COLLARES T, CAMPOS VF, SEIXAS FK, CAVALCANTI PV, DELLAGOSTIN OA, MOREIRA HL, DESCHAMPS JC. Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. **Journal of Biosciences**, v.35, p.39–47, 2010.

FISCHER D, BIEBER T, LI Y, ELSASSER HP, KISSEL T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v.16, p.1273–1279, 1999.

KANG JH, HAKIMOV H, RUIZ A, FRIENDSHIP RM, BUHR M, GOLOVAN SP. 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 TS, LEE SH, GANG GT, LEE YS, KIM SU, KOO DB, SHIN MY, PARK CK, LEE DS. Exogenous DNA Uptake of Boar Spermatozoa by a Magnetic Nanoparticle Vector System. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.201–206, 2010.

LANES CF, SAMPAIO LA, MARINS LF. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Theriogenology**, v.71, p. 525–533, 2009.

LEVIS SR & DEASY PB. Characterisation of halloysite for use as a microtubular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.243, p.125–134, 2002.

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

VERGARO V, ABDULLAYEV E, LVOV YM, ZEITOUN A, CINGOLANI R, RINALDI R, LEPORATTI S. Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes. **Biomacromolecules**, v.11, p.820–826, 2010.

WALL RJ. New gene transfer methods. **Theriogenology**, Beltsville, v.57, p.189–201, 2002.

WU Y, PHILLIPS JA, LIU H, YANG R, TAN W. Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. **ACS Nano**, v.2, p.2023–2028, 2008.

YAO H, NG SS, TUCKER WO, TSANG YK, MAN K, WANG XM, CHOW BK, KUNG HF, TANG GP, LIN MC. The gene transfection efficiency of a folate-PEI600-cyclodextrin nanopolymer. **Biomaterials**, v.30, p.5793–5803, 2009.