FERNANDA SEVCIUC MARIA

Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica
mediada por espermatozoides em camundongos

São Paulo
2012

FERNANDA SEVCIUC MARIA

Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica mediada por espermatozoides em camundongos

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

De acordo:

Orientador

Mayra Ortiz Assumpção
Professora
VRA - FMVZ - USP

São Paulo
2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO

032617

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2586
FMVZ

Sevciuc, Fernanda Maria

Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica mediada por espermatozoides em camundongos / Fernanda Sevciuc Maria. -- 2012.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. ATA. 2. Transgenia animal. 3. PCX-EGFP. 4. COMETA alcalino. 5. PCR em tempo real. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O uso de inibidores de endonucleases aumenta a eficiência da transferência gênica mediada por espermatozóides (TGME)?", protocolado sob o nº 1883/2010, utilizando 20 (vinte) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/03/2010.

We certify that the Research "The use of endonuclease inhibitors can increase the efficiency of sperm mediated gene transfer (SMGT)?", protocol number 1883/2010, utilizing 20 (twenty) mice, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 03/24/2010.

São Paulo, 25 de março de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SEVCIUC, Fernanda Maria

Título: Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica mediada por espermatozóides em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A Deus
A meus pais
E aos meus avôs*

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver"*

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus maiores amores: meus pais, sem os quais nada disso se tornaria possível, obrigada pelo apoio em todos os momentos, pelo carinho, compreensão, confiança nas minhas escolhas e amor incondicional.

Aos meus avós, que são meus exemplos de perseverança e de vida, amo vocês, obrigada por acreditarem em mim. Ao meu irmão e sua família por me apoiarem e torcerem por mim, Henrique amor da titia, obrigada pelo carinho e pelas brincadeiras. À toda a minha família, por cada um, com seu jeitinho, participar da minha formação.

Agradeço ao meu Lindo (Tiago) pela compreensão e paciência, muitas vezes necessária, por ser companheiro e amigo, e estar do meu lado sempre, amo você.

À minha orientadora, Mayra, por me ensinar a confiar sempre e enfrentar todos os desafios, ser amiga, chefe e educadora ao mesmo tempo. Obrigada pelo exemplo, carinho, e dedicação, me mostrando que sempre é possível tornar tudo melhor, agradeço por possibilitar que eu me tornasse parte da família VRA, nestes últimos 5 anos. Ao Visintin, que sempre ao me encontrar continuava perguntando: Com o quê você quer trabalhar? Fazendo-me convencê-lo de que eu realmente tinha paixão pela área e me mostrando que com ela é possível enfrentar o mundo e vencer, sob quaisquer circunstâncias.

À Camilla, quem me ensinou como trabalhar dentro do laboratório, sempre tentando me mostrar que eu era capaz e me ajudando em todos os problemas que surgiam, obrigada por ser amiga e professora, por todo carinho e acima de tudo por me incentivar sempre a buscar meu caminho. À Flavia por ser meu exemplo de dedicação, pelas conversas e conselhos. À Thais por toda a paciência para mais uma análise estatística, pelas risadas, baladinhas e amizade. Ao Zeca, por sempre trazer um pouco de alegria ao laboratório, Rafa por me mostrar que é possível dormir pouco ter mil coisas a fazer e concluir, Pedrito, por sempre se preocupar comigo e estar disposto a ajudar, ao Everton, pela disposição, à Júlia pelo carinho e muitos conselhos, você é quem brilha, ao Samir pelo apoio sempre, ao Robinson pela prontidão a ajudar.

À Renata, Mari Groke, Febem, Alê, Maran, Weber, Paulo e todos que passaram pelo laboratório, por serem exemplos de dedicação e conquistas.

Fabíola e Maza, obrigada por serem excelentes professoras e pesquisadoras. Aos ICs: Mari Xum, Letícia e Giana por me mostraram que é possível sonhar. À Patrícia e Juliana, pelo carinho. Jessica, Érika, Enrico, Mariana, pelo apoio.

Aos amigos Adriano e Mari Giassetti, por me aguentarem sempre, pelas risadas, convivência e carinho. Fura, obrigado por todos os cometas, pelas horas de citômetro no fim de semana, por todas as conversas, pela terapia por msn, *crazy things* no Vivo's e milhares de outros lugares e por sempre estar presente em minha vida. Mari, Xuxua, sem palavras para agradecer, mais que amiga, uma irmã, agradeço por todo apoio, puxões de orelha, amizade e por ter me ajudado a ser a pessoa que sou hoje. Vocês dois tem grande participação nisso, obrigada.

Também gostaria de agradecer a Profa. Camila e suas meninas (Cris, Fe e Liege) e menino (Dani) muito obrigada pela amizade e força, Li, obrigada pelos cabelos em *looks* lindos, Cris, obrigada pelas conversas e companhia para o que der e vier, Fê, obrigada pela convivência, pelas risadas, e o bom humor sempre. Ao Marcílio por mostrar que o VRA é muito mais do que um depto da FMVZ, e sim uma família. Ao grupo da Profa. Valquíria e do Prof. Pietro, pela força.

Ao grupo da Profa. Paula Papa, pela ajuda e disposição. Ao grupo da pesquisadora Elizabeth Martins, em especial Érika e Henrique pelas dicas, conselhos e prontidão em ajudar.

Aos funcionários do VRA, Harumi, Thais, Alice, Roberta, Miguel, Irailton, Belau e Luis, por possibilitarem a execução de tudo isso, à Dona Silvia pelos sorrisos e carinho sempre.

Ao Fiapo, Bê e Guapíssima, companheiros de quase dois anos que sempre me apoiaram e me deram forças, saudades de vocês.

As funcionárias da biblioteca, em especial a Elza e Helena pela paciência e por tornarem mais fácil nossa vida de formatações.

À Universidade de São Paulo, à FMVZ e ao VRA por me acolherem e me proporcionaram a infraestrutura para o desenvolvimento de todo o projeto.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

SEVCIUC, F. M. Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica mediada por espermatozoides em camundongos [Effect of endonucleases inhibitor in mice sperm mediated gene transfer]. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A baixa eficiência e a dificuldade de reprodução de resultados da técnica de transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME) têm como possível explicação à ativação de endonucleases espermáticas. Assim, a inibição desta enzima poderia evitar a fragmentação de DNA (exógeno e genômico), possibilitando assim, o uso de maiores concentrações de DNA exógeno, aumentando a eficiência e garantindo a reprodutibilidade da técnica. O ácido aurintricarboxílico (ATA) é um inibidor geral de endonucleases (HALLICK et al., 1977), inclusive das endonucleases espermáticas (MAIONE et al., 1997; MAGNANO et al., 1998). Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a inibição das endonucleases espermáticas, pelo ácido aurintricarboxílico (ATA). Para isso, três experimentos foram realizados: 1) avaliar a inibição das endonucleases espermáticas pela adição do ácido aurintricarboxílico, após incubação com DNA exógeno; 2) verificar a eficiência do ATA na inibição de fragmentação de DNA genômico e 3) detectar o aumento nos índices de internalização após o uso de ATA. Para o primeiro experimento, um ensaio de digestão plasmidial com os plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE3 e três concentrações de ATA (10 μ M, 25 μ M e 50 μ M) foram testados. As digestões dos vetores plasmidiais ocorreram pela incubação dos plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE3, com e sem a presença de ATA, com extratos espermáticos. As incubações ocorreram durante 1 hora à 37°C e os produtos foram analisados por eletroforese (2 horas, 100mV) em gel de agarose 0,7%. Os resultados foram avaliados em escala de cruces, no qual 1 foi considerado digestão total dos plasmídeos e 3, a não digestão. Os resultados foram analisados em nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram diferenças nas digestões dos dois vetores plasmidiais, sendo o pmGENIE3 mais susceptível à degradação

pelo extrato espermático, demonstrando ausência de bandas em algumas replicatas (mediana=1). O PCX-EGFP apresentou inibição parcial da degradação já com 10 μ M de ATA. Já o pmGENIE só apresentou inibição da degradação com 25 ou 50 μ M de ATA. Assim a concentração utilizada nos experimentos consecutivos foi a de 50 μ M. Para o experimento 2, espermatozoides de camundongos da linhagem Bl-6/DBA (F1) foram incubados com duas concentrações (500 ou 1000ng) do plasmídeo PCX-EGFP, com ou sem pré-incubação com ATA. As incubações ocorreram durante 5 horas, em ar com 5% de CO₂ à 37°C. Assim, os espermatozoides foram submetidos ao teste de susceptibilidade à denaturação ácida e ao ensaio de cometa alcalino para verificar possível fragilidade da cromatina. Os dados demonstraram que o uso do ATA em espermatozoides murinos leva à fragilidade do genoma, independente de serem incubados com DNA exógeno e a concentração do mesmo. Além disso, foi possível verificar que pode existir um limiar de concentração ótima para que as endonucleases causem fragmentação do DNA cromossomal, o qual foi de 500ng. O uso de concentrações maiores, como 1000ng, pode ter agido como fator protetor ao DNA genômico, podendo este DNA exógeno ter sido o alvo primário das endonucleases, já que quando as amostras foram incubadas com essa concentração de plasmídeo, não houve altos índices de fragmentação no DNA endógeno. No experimento 3, espermatozoides de camundongos foram incubados com 500 ou 1000ng de PCX-EGFP/10⁶ células, sendo ou não pré-incubados com ATA. O DNA genômico das células espermáticas foi extraído pelo método de fenol clorofórmio, diluído para concentração de 1ng/ μ l e submetidos à quantificação de DNA plasmidial pela técnica de quantificação absoluta em tempo real (qPCR). Os resultados demonstraram que o ATA não melhorou a eficiência de incorporação, já que tanto na concentração de 500 quanto na de 1000ng de DNA exógeno, a porcentagem foi menor (0,001% para os dois grupos) em relação aos grupos nos quais este não foi utilizado. Os grupos em que o ATA não foi utilizado não apresentaram diferença entre si demonstrando que

a quantidade de 500ng de DNA exógeno foi suficiente na internalização deste ao espermatozoide, sendo a porcentagem de incorporação maior do que 1000ng (0,20% contra 0,10%). Contudo, o uso do inibidor de endonucleases, ao invés de aumentar os índices de incorporação apresentou resultados opostos, indicando que seu uso não trouxe melhorias para a técnica de TGME.

Palavras Chave: ATA, Transgenia animal, PCX-EGFP, COMETA alcalino, PCR em tempo real

ABSTRACT

SEVCIUC, F. M. Effect of endonucleases inhibitor in mice sperm mediated gene transfer [Efeito de inibidores de endonucleases na transferência gênica mediada por espermatozoides em camundongos]. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The low efficiency and low repeatability of sperm-mediated gene transfer (SMGT) could be due to the activation of sperm endonucleases. The inhibition of this enzyme would avoid genomic DNA fragmentation enabling the use of higher concentrations of exogenous DNA, increasing the efficiency and ensuring the reproducibility of this technique. Aurintricarboxylic acid (ATA) is a general inhibitor of endonucleases (HALLICK et al., 1977), including sperm endonucleases (MAIONE et al., 1997; MAGNANO et al., 1998). This study aimed to evaluate the inhibition of sperm endonucleases using the aurintricarboxylic acid (ATA). For that, three experiments were set: 1) evaluate the inhibition of sperm endonucleases by adding aurintricarboxylic acid after incubation with exogenous DNA, 2) study the inhibition efficiency of ATA in genomic DNA fragmentation and 3) detect exogenous DNA internalization after the use of ATA. For the first experiment, a plasmid digestion assay with pmGENIE3 and PCX-EGFP and three concentrations of ATA (10 μ M, 25 μ M and 50 μ M) were tested. The digestion of plasmid vector occurred by incubation of PCX-EGFP and pmGENIE3 with and without the presence of ATA with sperm extracts. Incubations took place for 1 hour at 37°C and the products were analyzed by electrophoresis (2 hours, 100mV) in 0,7% agarose gel. The results were evaluated on a cross scale whereas 1 was considered a total plasmid digestion and 3 no digestion. The results were analyzed with a significance level of 5%. The results show differences in the digestion of the two plasmid vectors, being pmGENIE3 more susceptible to degradation by sperm extract, demonstrating absence of bands in some replicates (median = 1). The PCX-EGFP showed a partial inhibition of the degradation using 10 μ M ATA. PmGENIE3 presented inhibiting of degradation only using 25 or 50 μ M of ATA. Thus, the concentration used in the consecutives experiments was 50 μ M. For experiment 2, sperm from Bl-6/DBA (F1) mice strain were incubated with two concentrations (500 or 1000ng) of the PCX-EGFP plasmid, with and without pre-incubation with ATA. Incubation took place for 5 hours, with 5% CO₂ in air, at 37°C. Sperm samples were subjected to acid denaturation susceptibility test and alkaline comet assay to check for possible chromatin fragility. The data showed that the use of ATA in murine sperm leads to a fragility of their genome, independently of the incubation with exogenous DNA and its concentration. Result

showed that there might be a threshold concentration for chromosomal DNA fragmentation caused by endonucleases, which was 500ng of plasmid. The use of higher concentrations, as 1000ng, may be a protective factor for genomic DNA integrity, since exogenous DNA seems to be the primary target of endonucleases, showed by, lower DNA fragmentation levels. In experiment 3, sperm were incubated with 500 or 1000ng PCX-EGFP/106 cells, pre-incubated or not with ATA. Genomic DNA was extracted by phenol chloroform method, diluted to concentrations of 1ng/μl and subjected to quantification of plasmid DNA insertions by absolute quantification in real-time PCR (qPCR). The results showed that ATA did not improve the efficiency of DNA internalization, whereas both concentration of 500 and 1000ng presented a lower percentage of exogenous DNA integration (0.001% in both groups) compared with the groups in which ATA was not used. The groups without ATA did not differ indicating that the amount of 500ng of DNA was able to integrate exogenous DNA to sperm, and have higher percentage of incorporation compared to 1000ng (0,20% versus 0,10%). Thereby, the use of an endonuclease inhibitor instead of increasing integration indexes showed opposite results, indicating that its use did not bring improvements to the SMGT technique.

Key words: ATA, Animal transgenesis, PCX-EGFP, COMET assay, Real time PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo hipotético da informação genética transcrita reversamente em espermatozoides–São Paulo, 2012.....	28
Figura 2	Diagrama do vetor pCX-EGFP – São Paulo, 2012.....	39
Figura 3	Diagrama do vetor pmGENIE3 + mPB gene com íntron CAG RFP alone 2 – São Paulo, 2012.....	40
Figura 4	Imagem representativa obtida por microscopia de epifluorescência em aumento de 200 vezes. Coloração do extrato espermático com H342 – São Paulo, 2012.....	45
Figura 5	Delineamento Experimental utilizado nos experimentos 2 e 3 – São Paulo, 2012.....	49
Figura 6	Descrição gráfica da relação temperatura pelo tempo da reação de qPCR - São Paulo 2012.....	56
Figura 7	Foto de gel do ensaio de digestão plasmidial (replicata 2)- São Paulo 2012.....	63
Figura 8	Histogramas gerados pelo software Flow Jo 9.4.11, relativos a análise do SCDA – São Paulo, 2011.....	66
Figura 9	Microscopia de epifluorescência do ensaio cometa alcalino - São Paulo – 2012.....	67
Figura 10	Imagem de microscopia de epifluorescência submetida a quantificação no software Comet Score TM . São Paulo 2012.....	67
Figura 11	Imagem de microscopia de epifluorescência submetida à quantificação de fragmentação de DNA pelo software Comet Score TM . São Paulo 2012.....	68
Figura 12	Ilustração da quantificação absoluta do PCX-EGFP em cada tratamento – São Paulo, 2011.....	77
Figura 13	Histogramas das populações de Alfa T Y log – São Paulo, 2012.....	96
Figura 14	Imagem representativa da curva padrão da primeira reação de qPCR realizada no experimento 3. Curva de quantificação (A) e de dissociação (B) – São Paulo, 2012.....	98

Figura 15	Imagem representativa da curva padrão da segunda reação de qPCR realizada no experimento 3. Curva de quantificação (A) e de dissociação (B) – São Paulo, 2012.....	99
-----------	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Mediana da escala de cruzes da digestão do PCX-EGFP nos diferentes grupos experimentais - São Paulo, 2011.....	61
Gráfico 2	Mediana da escala de cruzes na digestão do pmGENIE3 nos diferentes grupos experimentais . – São Paulo, 2011.....	61
Gráfico 3	Comprimento do cometa (px) - São Paulo 2012.....	69
Gráfico 4	Porcentagem (%) de DNA na cabeça de cometa - São Paulo, 2012.....	69
Gráfico 5	Porcentagem (%) de DNA na cauda de cometa - São Paulo, 2012.....	70
Gráfico 6	Comprimento da cauda de cometa (px) -São Paulo, 2012.....	71
Gráfico 7	Diâmetro da cabeça de cometa (px) – São Paulo 2012.....	72
Gráfico 8	Área da cauda de cometa (px) – São Paulo, 2012.....	72
Gráfico 9	Intensidade da cauda de cometa (px) - São Paulo, 2012.....	73
Gráfico 10	Momento da cauda de cometa - São Paulo, 2012.....	74
Gráfico 11	Olive moment- São Paulo, 2012.....	74
Gráfico 12	Gráfico de colunas para a variável células positivas ao SCDA - São Paulo, 2011.....	75
Gráfico 13	Representação gráfica da equação de reta estabelecida com a padronização do SCDA- São Paulo, 2012.....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Grupos experimentais do experimento 1.....	47
Quadro 2	Identificação dos grupos experimentais referentes ao experimento 2.....	49
Quadro 3	Variáveis obtidas na análise do ensaio de cometa alcalino pelo software Comet Score™ e suas definições.....	53
Quadro 4	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR de quantificação absoluta em tempo real.....	56
Quadro 5	Variáveis transformadas aritmeticamente para cumprimento das premissas estatísticas.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mediana e quartis superior (Q1) e inferior (Q3) dos plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE3 em cada um dos 9 grupos experimentais – São Paulo, 2011.....	60
Tabela 2	Parâmetros avaliados pelo teste cometa alcalino e porcentagem de células positivas ao SCDA- São Paulo, 2012.....	65
Tabela 3	Resultados da análise estatística do Experimento 3 - São Paulo, 2011.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATA	Ácido aurintricarboxílico
µg	Micrograma
µl	Microlitro
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
Ct	<i>Cycle Treshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Grama
h	Hora
H342	Hoechst 33342
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Litro
LA	Laranja de acridina
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
ms	Milisegundo
ng	Nanograma
px	Pixel
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pg	Picograma
qPCR	PCR de quantificação absoluta em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia-Transcriptase Reversa
s	Segundo
SCDA	Susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida
U	Unidade Internacional
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

™	Trade Mark
°C	Graus Celsius
<	Menor que
>	Maior que
+	Mais
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
<	Menor que
–	Menos
μ	Micro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2111
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Transferência gênica mediada por espermatozoides	25
2.2 Endonucleases e Fragmentação de DNA em espermatozoides.....	30
2.3 Ácido Aurintricarboxílico (ATA).....	32
3. HIPÓTESE.....	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Gerais.....	36
4.2 Específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODO	37
5.1 DNA exógeno.....	38
5.2 Transformações das bactérias	41
5.3 Extração do DNA plasmidial	41
5.4 Coleta dos espermatozoides	43
5.5 Ensaio de digestão plasmidial.....	43
<i>5.5.1 Obtenção do extrato espermático</i>	<i>44</i>
<i>5.5.2 Incubação do extrato espermático</i>	<i>45</i>
<i>5.5.3 Avaliação do ensaio de digestão plasmidial</i>	<i>45</i>
5.6 Delineamento experimental	46
<i>5.6.1 Verificação da inibição do ATA na digestão plasmidial.....</i>	<i>46</i>
5.7 Linearização e precipitação do DNA plasmidial	48
5.8 Delineamento experimental	48
<i>5.8.1 Colheita dos espermatozoides</i>	<i>50</i>
<i>5.8.2 Incubações</i>	<i>50</i>
<i>5.8.3 Detecção da ação do ATA sobre as endonucleases espermáticas</i>	<i>50</i>
<i>5.8.3.1 Teste de susceptibilidade da cromatina espermática à denaturação ácida (SCDA)</i>	<i>51</i>
<i>5.8.3.2 Ensaio de cometa alcalino</i>	<i>51</i>
5.9 Delineamento experimental	54
<i>5.9.1 Extração de DNA espermático</i>	<i>54</i>
<i>5.9.2 Detecção dos índices de transfecção por PCR em tempo real.....</i>	<i>55</i>
5.10 Análise Estatística.....	57
6 RESULTADOS	59
7 DISCUSSÃO	78
8 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES	94
ANEXOS	100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Espermatozoides são tradicionalmente considerados células inertes metabolicamente, cuja função exclusiva reside na contribuição do genoma paterno para o zigoto diploide. Este ponto de vista repousa sobre a observação de que estas células tem essencialmente uma grande cabeça, que contém o genoma do sexo masculino em uma estrutura bem compactada, e um flagelo que atua como aparelho motor. A porção citoplasmática de células é extremamente reduzida e retém mais se não todas as funções metabólicas características de células somáticas (PITTOGGI et al., 1999).

Os espermatozoides possuem a habilidade intrínseca de ligar e de internalizar DNA exógeno (LAVITRANO et al., 1989). Assim esta habilidade tem sido utilizada para a produção de animais transgênicos, determinando-se a técnica de Transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME). A transferência gênica mediada por espermatozoides é um método fácil e de baixo custo usado para produzir animais transgênicos (LAVITRANO et al., 2006). Apesar de apresentar resultados de sucesso há grande número de estudos com fraca reprodutibilidade, sendo as causas ainda não bem compreendidas (KHANG et al., 2008). Uma das possíveis explicações para os resultados baixos e inconstantes na técnica de TGME poderia ser a ativação de nucleases espermáticas.

Na TGME, as endonucleases espermáticas são ativadas quando a célula é desafiada com DNA exógeno, levando à degradação de DNA plasmidial e em última instância de DNA cromossomal (SCIAMANNA et al., 2000).

Maione et al. (1997) demonstraram que a ativação das nucleases endógenas pela interação de DNA exógeno com células espermáticas acontece de maneira DNA dose-dependente.

Assim com um bloqueio nesta possível barreira natural poderia ser aumentada a concentração de DNA exógeno utilizada nos protocolos de TGME, sem causar danos aos espermatozoides. O aumento da concentração de DNA exógeno, durante a incubação, poderia ocasionar maior reprodutibilidade da técnica, a qual seria melhor aceita na produção eficiente de animais transgênicos.

Um inibidor geral de endonucleases, como, por exemplo, o ácido aurintricarboxílico (ATA) poderia, caso incorporado ao protocolo de TGME, melhorar os resultados da técnica. O ATA é um corante derivado de trifenilmetano que inibe grande número de nucleases, sendo considerado um inibidor geral (HALLICK et al., 1977).

O ATA apresenta como vantagens ser barato, altamente solúvel em água, comercialmente disponível e bem estabelecido como inibidor de apoptose em vários tipos celulares, mostrando-se eficiente na inibição de endonucleases espermáticas, quando estas são desafiadas com altas concentrações de DNA exógeno (HALLICK, 1977; MAIONE et al., 1997; MAGNANO et al., 1998; GLASSPOOL-MALONE; MALONE, 1999; LEE; KIM, 2008).

Com isso, o presente estudo objetivou, a partir da inibição das endonucleases espermáticas, melhorar a eficiência da TGME. Para isso, primeiramente determinou-se a melhor concentração de ATA a ser utilizada para a inibição das endonucleases espermáticas (experimento 1), verificou-se em seguida se houve inibição da fragmentação de DNA espermático com o uso do inibidor (experimento 2) e avaliou-se a incorporação de DNA exógeno às células espermáticas murinas por quantificação absoluta em tempo real (experimento 3).

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A transferência gênica mediada por espermatozoides (TGME) é uma técnica de transgenia animal utilizada nos últimos 40 anos. A possibilidade de moléculas de DNA exógeno serem incorporadas ao espermatozoide foi descoberta por BRACKETT et al. (1971) e primeiramente utilizada em camundongos para a transgenia, por LAVITRANO et al. (1989) com alta eficiência. Esta técnica até hoje intriga os pesquisadores, acarretando em tentativas de aprimoramento da técnica e sucessíveis explicações.

2.1 Transferência gênica mediada por espermatozoides

A TGME utiliza a célula espermática como vetor para introdução de DNA exógeno em um oócito durante o processo de fecundação (LAVITRANO et al, 1989). A associação do espermatozoide com o DNA exógeno é o primeiro e talvez o passo mais crítico na produção de espermatozoides geneticamente modificados (ZANI et al., 1995).

A capacidade de células espermáticas capturarem DNA exógeno foi reportada em estudo pioneiro de Brackett et al. (1971). Em 1989, Lavritano et al. demonstraram que a TGME é possível em camundongos, com alta eficiência. Este achado foi ratificado em seguida por diversos grupos (ZORAQI; SPADAFORA, 1997; MAIONE et al., 1998; LAVITRANO et al., 2002; COWARD et al., 2006; FEITOSA et al., 2010; HAREL-MARKOWITZ et al., 2009; CAMPOS et al., 2011 LI et al., 2006;).

2.1.1 Mecanismos da TGME

A TGME baseia-se no princípio da habilidade intrínseca dos espermatozoides captarem e internalizarem DNA exógeno no núcleo.

As moléculas de DNA exógeno ligam-se ao segmento equatorial e à região subacrossomal da cabeça dos espermatozoides (CAMAIONI, 1992). A interação é iônica, reversível, independente da sequência e não é restrita exclusivamente às moléculas de DNA,

podendo ocorrer com outras macromoléculas carregadas negativamente, como RNA ou polissacarídeos. (SPADAFORA; SCIAMANNA; PITTOGGI, 2005).

O processo de ligação e internalização de DNA ao invés de ser um evento randômico é um processo muito específico mediado por fatores proteicos. Uns destes fatores de ligação são as “DNA binding proteins (DBPs)”, proteínas espermáticas com propriedades de ligação ao DNA das quais, foram descobertas três classes: uma de baixo peso molecular, menor que 20kDa que apresentam mobilidade eletroforética compatível com as protaminas; uma segunda de peso molecular entre 30-35 kDa e, uma terceira, classe com peso molecular de 50kDa. A classe de 30-35kDa demonstrou manter um mesmo padrão eletroforético entre diferentes espécies de mamíferos, e está associada à superfície celular espermática, sendo a mais estudada na TGME, atuando como substrato da ligação DNA exógeno - célula espermática (ZANI et al., 1995; LAVITRANO et al., 1997; SPADAFORA, 1998).

No processo de interação entre espermatozoide e DNA exógeno também há a participação de fatores do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe II e as glicoproteínas de superfície de membrana CD4 (ZANI et al., 1995). Espermatozoides de camundongos *knockout* para MHC de classe II têm redução de 50% na habilidade de se ligar ao DNA quando comparados aos camundongos de linhagens selvagens (LAVITRANO et al., 1997). Já espermatozoides de camundongos *knockout* para CD4 são totalmente capazes de se ligarem com o DNA exógeno, no entanto perdem a capacidade de internalização (LAVITRANO et al., 2006). Assim, apesar de moléculas de MHC II nunca terem sido encontradas em células espermáticas adultas, sua expressão durante a espermatogênese parece ser necessária para habilitar o espermatozoide a se ligar ao DNA exógeno. Já moléculas de CD4 são as responsáveis pela internalização nuclear do DNA ligado ao espermatozoide, pois células espermáticas de linhagens selvagens incubadas com anticorpos anti-CD4 inviabilizam a internalização nuclear (LAVITRANO et al., 1997).

As células espermáticas encontram-se protegidas da intrusão de moléculas de DNA exógenas devido à existência de um fator inibitório glicoprotéico denominado IF-1, presente no fluido seminal de mamíferos. O IF-1 faz com que haja perda de habilidade de ligação das DBPs de 30-35 kDa com moléculas de DNA, bloqueando a interação do DNA exógeno ao espermatozoide (ZANI et al., 1995; LAVITRANO et al., 1997; LAVITRANO et al., 2006).

Após interação e internalização do DNA exógeno no núcleo espermático o passo subsequente envolve a integração deste no genoma do espermatozoide (LAVITRANO et al., 2006).

Após a internalização nuclear, o DNA exógeno fica fortemente ligado ao esqueleto nuclear. Zoraqui e Spadafora (1997) construíram uma biblioteca genômica usando DNA extraído de células espermáticas pré-incubadas com o plasmídeo PSV2CAT DNA. Dois clones foram escolhidos aleatoriamente para o sequenciamento (7Kb e 8,5Kb) e em ambos, o plasmídeo tinha sido integrado ao genoma e, mais interessante, o sítio de integração tinha sido o mesmo. Por ter uma sequência *consensu* de topoisomerase II em uma das extremidades, os autores sugeriram que esta enzima tenha um papel nesta recombinação não homóloga (MAGNANO et al., 1998; SPADAFORA, 1998).

Outra enzima também com papel na integração de DNA exógeno ao espermatozoide seriam as nucleases. Sequências exógenas internalizadas ao atingirem o esqueleto nuclear são submetidas a rearranjos mediados por nucleases endógenas e eventos de recombinação, que eventualmente podem causar a integração no genoma espermático (SPADAFORA, 2008). De acordo com Szczygiel, Moisyadi e Ward (2003) a integração do transgene requer ligases, além das endonucleases.

Pittogi et al. (1999) relatam que o alvo de ligação do DNA exógeno ao genoma espermático são as porções genômicas espermáticas restritas organizadas em domínios nucleossomais, denominadas frações hipersensíveis de DNA. Estas porções são ricas em sequências de retroposons, sugerindo que as frações hipersensíveis da cromatina podem ser transposicionalmente competentes, o que, poderia ter papel importante na TGME.

Em 2008, Spadafora sugeriu um mecanismo de integração de DNA exógeno ao genoma espermático dependente da transcriptase reversa espermática. Neste mecanismo, as moléculas de DNA internalizadas no núcleo espermático são primeiramente transcritas a RNA e sofrem transcrição reversa a DNA complementar (DNAC) pela maquinaria de retrotransposição da transcriptase reversa endógena. Uma pequena porção deste DNAC pode ser integrada em frações hipersensíveis da cromatina espermática, que retém uma organização nucleossomal estando localizada, provavelmente, entre domínios adjacentes às protaminas. As demais cópias, ou seja, a maioria seria propagada após transferência para o oócito, durante a fecundação, para os tecidos da prole, como estruturas extracromossomais (Figura 1).

Figura 1- Modelo hipotético da informação genética transcrita reversamente em espermatozoides –São Paulo, 2012.

Fonte: Adaptado de SPADAFORA, 2008.

Legenda: RNA exógeno ou moléculas de DNA se ligam às proteínas de ligação do DNA (DBP, azul) localizadas na superfície do espermatozoide, desde que o factor inibitório (IF-1, vermelho) não interfira. O complexo DNA / DBP interage com moléculas CD4 (verde), sendo internalizado no núcleo e, eventualmente, dissocia-se na matriz nuclear, libertando assim as moléculas de DNA exógenas; Os complexos DNA/DBP/CD4 podem então ser reciclados para a superfície celular. As moléculas de DNA internalizadas são primeiramente transcritas para RNA e então transcritas reversamente para DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa endógena (RT) contendo a maquinaria de retroposição (representada pela matriz associada castanha oval). Moléculas de RNA são transcritas reversamente a cópias de cDNA em um processo de uma etapa. Uma pequena proporção do cDNA resultante pode, eventualmente, integrar a sítios "acessíveis" da cromatina espermática, que retêm uma organização nucleossomal e são provavelmente localizados entre os domínios adjacentes a protamina. Em vez disso, a grande maioria de cópias de cDNA, após a entrega para os oócitos no momento da fecundação, propagam nos tecidos da prole em forma de estruturas extra-cromossômicas (círculos vermelhos). PM, membrana plasmática; NM, membrana nuclear; IF-1 fator inibidor 1.

2.1.2 Problemática da TGME

Estudos recentes da TGME fornecem bases sólidas para a noção de que espermatozoides podem agir como vetores para sequências genéticas exógenas. Entretanto, o destino final destas sequências nem sempre é previsível (SMITH; SPADAFORA, 2005). Apesar de apresentar resultados bem sucedidos, a TGME permaneceu como uma técnica de transgênese controversa por quase 20 anos devido a um grande número de estudos com baixa reprodutibilidade, o que ainda não pôde ser elucidado (KANG et al., 2008). Um aspecto significativo é que uma integração estável do transgene é raramente detectável com os protocolos de TGME (SMITH; SPADAFORA, 2005).

O uso de espermatozoides para transgênese tem sido bastante estudado, e várias abordagens distintas têm sido desenvolvidas, entretanto, a eficiência da TGME precisa ser radicalmente melhorada (KANG et al., 2008; CAMPOS et al., 2011).

Dado que o trato reprodutivo contém moléculas de DNA livre, originadas de morte celular natural e quebra do mesmo; a pergunta de como o organismo protege a linhagem reprodutiva da invasão por DNA exógeno sobre condições naturais é cabível (SMITH; SPADAFORA, 2005; KANG et al., 2008).

Alguns resultados como a ativação de endonucleases (MAIONE et al., 1997; MAGNANO et al., 1998; SZCZYGIEL; MOISYADI; WARD, 2003; YAMAUCHI et al., 2007), e a diminuição da motilidade espermática quando da ligação da célula à molécula de DNA exógeno (SCHELLANDER et al., 1995; ANZAR; BUHR, 2002) demonstram existir defesas naturais que são ativadas no espermatozoide, após ligação com o DNA exógeno, podendo ser a causa da baixa reprodutibilidade da técnica (KANG et al., 2008).

Assim um bloqueio nesta possível barreira espermática natural poderia levar a uma maior reprodutibilidade da TGME, tornando-a mais eficiente na produção de animais transgênicos.

2.2 Endonucleases e Fragmentação de DNA em espermatozoides

Maione et al. (1997) demonstraram que a interação de DNA exógeno com células espermáticas ativa nucleases endógenas. Esta interação é DNA dose-dependente, uma vez que moléculas intactas de DNA exógeno são observadas no núcleo de células espermáticas desafiadas com baixas quantidades de DNA, enquanto que em altas quantidades há indução de fragmentação de DNA. Este fato implica na impossibilidade de se aumentar a concentração de DNA exógeno nos protocolos de TGME, com o intuito de aumentar a eficiência da técnica.

Sciammani et al. (2000) afirmaram que espermatozoides de diferentes origens, do ejaculado ou do epidídimo, respondem de maneira distinta à interação com DNA exógeno. Segundo estes autores, espermatozoides epididimários, em caso de murinos, ativam prontamente a nuclease endógena, causando a degradação de ambos, DNA exógeno e domínios específicos da cromatina espermática.

No entanto, Yamauchi et al. (2007) estudaram a atividade de endonucleases espermáticas em murinos, em diferentes sub-regiões do epidídimo, canal deferente e do ejaculado (células espermáticas recuperadas de útero de fêmeas recém-acasaladas). Os autores verificaram que esta atividade mais fraca no corpo do epidídimo, ligeiramente mais forte na cauda, moderada no canal deferente, e mais forte no ejaculado, contrariando o trabalho de Sciammani et al. (2000). Por esta diferença de atividade e devido à maior praticidade de colheita dos espermatozoides epididimários, os protocolos de TGME na espécie murina utilizam espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo.

A ação das nucleases espermáticas é tempo dependente, sendo que a fragmentação do DNA tem início aos 30 minutos e é completa após 5 horas de incubação, restando-se apenas algumas quilobases de DNA (MAIONE et al., 1997).

A presença de nucleases em espermatozoides maduros, do qual a função é carrear DNA para o oócito, sem danos, parece contraintuitiva. Uma possibilidade seria prevenir a transmissão de danos potenciais no DNA para a nova progênie, sendo um mecanismo similar com a função de degradação cromossomal, que ocorre durante o processo de apoptose celular (SOTOLONGO et al., 2005).

Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo de eliminação celular envolvido em processos como embriogênese, metamorfose e regressão tumoral. Em nível molecular, a degradação de proteínas estruturais e funcionais é observada. A ativação de

endonucleases leva à clivagem do DNA celular em fragmentos de 180pb produzindo uma escada de DNA característica em gel de agarose, frequentemente vista na apoptose (COUNIS; TORRIGLIA, 2000)

Espermatozoides de mamíferos tem a habilidade de degradar seu próprio DNA por um mecanismo similar a apoptose. Quando este mecanismo é ativado, o DNA é primeiramente degradado pela topoisomerase IIB (TOP2B) em pequenos fragmentos. Sob certas condições, a nuclease então degrada o DNA adicional, digerindo todo o genoma espermático (SHAMAN et al., 2007). Segundo WARD (2011) este mecanismo também está presente na espermiogênese, sendo possível que a TOP2B seja parte de um “ponto de checagem” ainda não definido, que determina se a célula progride ao longo do seu curso da replicação celular ou diferenciação, ou se desvia para a apoptose.

O mecanismo de degradação do DNA espermático envolvendo a TOP2B e a nuclease espermática ocorre em duas etapas. Na primeira, o DNA espermático é degradado pela TOP2B em fragmentos entre 20 a 50Kb de comprimento. Esta fragmentação é reversível, basta tratar a célula com EDTA ou alta concentração de sal. Na segunda etapa, o DNA espermático é completamente degradado por nucleases ainda não identificadas, sendo a clivagem pela TOP2B um pré-requisito na subsequente digestão nucleolítica (SHAMAN et al., 2007).

O fato do espermatozoide conseguir degradar seu próprio genoma sugere que pelo menos um pequeno componente da cromatina espermática altamente condensada seja acessível a estas enzimas. Provavelmente, as regiões de ligação dos toróides ligadas às histonas sejam mais sensíveis à digestão por DNases do que regiões de toróide ligadas às protaminas (WARD; WARD, 2004). Os pontos de ligação dos toróides também contêm as regiões de ligação à matriz da cromatina espermática e, se assim for, os segmentos de DNA associados à matriz podem proporcionar ao embrião recém-fecundado locais de enucleação para descondensação de cromatina espermática (SHAMAN et al., 2007).

2.3 Ácido Aurintricarboxílico (ATA)

A maioria das endonucleases requerem íons de cálcio ou magnésio para serem ativas, sendo esta inibida pela presença de agentes quelantes, ou pelo pré-tratamento com o ácido aurintricarboxílico (ATA) (MAIONE, 1997; SZCZYGIEL; MOISYADI; WARD, 2003).

O ATA é um corante derivado de trifenilmetano conhecido por inibir reações enzimáticas de biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos. Inibe grande número de nucleases, sem levar em conta a maneira que esta cliva os ácidos nucleicos. Incluem endonucleases que agem em fitas simples de DNA (nuclease S1), em fita dupla de DNA (DNase I) ou em sítios específicos de DNA dupla fita (endonucleases de restrição). O ATA também inibe exonucleases (exonuclease III) e uma ribonuclease. Sendo razoável sugerir que o ATA é um inibidor geral de endonucleases (HALLICK et al., 1977).

As vantagens do ATA como um inibidor de nucleases são aparentes: é um reagente barato, altamente solúvel em água, comercialmente disponível e bem estabelecido como inibidor de apoptose em vários tipos celulares (HALLICK, 1977; GLASSPOOL-MALONE; MALONE, 1999; LEE; KIM, 2008). Além disso, o ATA mostrou ser eficiente na inibição de endonucleases espermáticas quando estes são desafiados com altas concentrações de DNA exógeno (MAIONE et al., 1997; MAGNANO et al., 1998). Apresentou ação comprovada sobre a topoisomerase, sendo um inibidor potente da topoisomerase II, agindo por meio da inibição da atividade catalítica e da prevenção de ligação ao DNA (BEMCHOKROUN et al., 1995).

ZACCAGNINI et al. (1998) descreveram que houve aumento da produção de embriões de duas células, produzidos por fecundação in vitro, quando da incubação prévia dos espermatozoides epididimários com o ATA. Os autores explicaram que esta incubação provavelmente preservou o núcleo espermático de danos espontâneos ou induzidos ou, favoreceu os eventos que desencadeiam a embriogênese.

Com o objetivo de responder à pergunta de que a pouca reprodutividade da TGME se explicava pela ação das endonucleases, este trabalho formulou a hipótese de que o ATA, inibiria a ação destas enzimas, melhorando a eficiência da TGME.

Com este cerne, o trabalho foi desenvolvido em 3 experimentos. O experimento 1 o qual foi verificado a melhor concentração do inibidor a ser utilizada; o experimento 2, no qual

foi verificada a fragmentação de DNA genômico espermático e o experimento 3, no qual foi analisada a eficiência deste sistema de inibição das endonucleases quando do uso do ATA.

HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.HIPÓTESE

A eficiência da TGME está diretamente relacionada à concentração de DNA exógeno utilizada nos protocolos. No entanto, quanto maior a concentração de DNA exógeno, maior será a ação das endonuclease espermáticas. O emprego de ATA (inibidor de endonuclease) impede a degradação do DNA espermático, permitindo o uso de maiores concentração de DNA exógeno nos protocolos de TGME.

4. OBJETIVOS

4.1 Gerais

1. Avaliar o potencial inibitório do ATA frente às endonucleases espermáticas.
2. Verificar a eficiência do ATA no controle da fragmentação do DNA genômico.
3. Avaliar o aumento da eficiência da TGME após o uso do inibidor de endonucleases.

4.2 Específicos

1. Estabelecer a concentração ideal de ATA ao qual a endonuclease é inibida
2. Verificar o padrão de digestão de diferentes plasmídeos pela endonuclease espermática
3. Averiguar a concentração de DNA exógeno, no qual o ATA tem melhor eficiência
4. Verificar a inibição da fragmentação de DNA genômico pelo ATA
5. Avaliar o índice de incorporação de PCX-EGFP no DNA de espermatozoides murinos submetidos à TGME com duas concentrações diferentes de plasmídeo e a adição ou não de ATA

MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados camundongos machos da linhagem F1 (B1-6 x DBA) entre 4 a 6 meses de idade, mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia do Espermatozoide da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Os camundongos foram mantidos sobre rotina dos procedimentos de criação estabelecidos pelo Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (1996). Isto inclui um foto período de 12 horas de luz: 12 horas de escuro e água e comida fornecidas ad libitum.

5.1 DNA exógeno

As construções gênicas utilizadas neste experimento foram os plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE-3, doados respectivamente pelo Centro de Informações Genômicas da Universidade de Osaka – Japão e pelo Instituto de pesquisas Biogênicas, da Universidade do Havaí em Manoa – Havaí.

O PCX-EGFP carrega uma variante vermelha e humanizada da proteína verde fluorescente (EGFP) que otimiza uma fluorescência mais brilhante e uma expressão mais elevada em células eucarióticas (excitação de 480 e emissão de 507 nanômetros).

Neste vetor, a região promotora e o primeiro íntron do gene da β -Actina de galinha foram clonados entre a região codificadora da EGFP e a região promotora do citomegalovírus (CMV), figura 2.

Figura 2- Diagrama do vetor pCX-EGFP – São Paulo, 2012.

Legenda: Seta verde superior corresponde à região promotora de citomegalovírus (CMV-IE); seta azul demarca a seqüência promotora do gene da beta-actina de galinha (beta-actin); linha azul corresponde ao primeiro íntron do gene de beta-actina de galinha (íntron 1); seta laranja inferior demarca a região codificadora do gene da GFP (EGFP cDNA).

O pmGENIE3 + mPB gene com íntron CAG RFP alone 2 (pmGENIE3) carrega uma proteína fluorescente monomérica vermelha (mRFP), o que melhora a eficiência de dobragem ou a estabilidade do monômero, sendo sua excitação de 584 nm e sua emissão máxima de 607 nm (Figura 3).

Figura 3. Diagrama do vetor pmGENIE3 + mPB gene com íntron CAG RFP alone 2 – São Paulo, 2012.

Legenda: Seta verde superior corresponde ao gene de resistência à ampicilina (Ampicilin resistance gene); seta tracejada corresponde ao domínio 5' de piggyBac (piggyBac 5'-Domain); seta verde inferior corresponde ao promotor GAG (GAG promoter); seguida por seta verde que demarca a região codificadora do gene RFP (mRFP). Seta vinho corresponde à região promotora de citomegalovírus (CMV enhancer), seguida de seta verde correspondente à sequência promotora do gene da beta-actina de galinha (Chicken b-actin promoter) e seta verde correspondente ao íntron de beta globina (beta-Globin Intron). Em seguida tem-se o códon inicial de Piggy Bac de camundongo (mouse códon bias piggyBac gene start), seguido pelo íntron quimérico (Chimeric Intron) e domínio 3' de piggyBac (piggyBac 3'-domain) e o gene de piggyBac de camundongo (mouse codon bias piggyBac gene).

5.2 Transformações das bactérias

A transformação de bactérias DHalfa5 competentes, com o plasmídeo PCX-EGFP e com o plasmídeo pmGENIE3 foi realizada com o seguinte protocolo:

As bactérias foram descongeladas à 0°C, em gelo e incubadas com 228ng de DNA plasmidial, durante 30 minutos, também a 0°C. Em seguida, procedeu-se à incubação a 42°C durante 2 minutos, em gelo a 0°C, por 5 minutos. Após este procedimento foi adicionado 450µl de meio líquido de cultura bacteriana (Lennox LB Broth Base, Invitrogen® Life Technologies - ANEXO A) sem adição de antibiótico, o qual permaneceu à 37°C, em água, durante 90 minutos. As bactérias foram semeadas em placas de Petri, de 100mm, previamente preparadas com 30ml de meio sólido de cultura bacteriana (Lennox LB Broth Base, Invitrogen® Life Technologies - ANEXO A), acrescido de ampicilina (SIGMA®, 50µg/µl).

Após 12 horas de crescimento, uma colônia foi selecionada e individualizada. Esta colônia foi colocada em 5ml de meio líquido com adição de ampicilina (SIGMA®, 50µg/µl), e permaneceu em incubadora à 37°C, durante 4 horas. Após este período, mais 45ml de meio líquido acrescido de ampicilina (SIGMA®, 50µg/µl) foi adicionado à cultura de bactérias, que permaneceu por 16 horas em incubadora à 37°C. O volume final da cultura bacteriana foi completado para 100ml de meio líquido, sendo acrescido mais 50ml do mesmo meio à cultura também com ampicilina. Esta solução foi mantida a 37°C por mais 16 horas, sendo então encaminhada para a extração do DNA plasmidial. As culturas foram realizadas em agitação orbital (Orbit 1000, Labnet®).

5.3 Extração do DNA plasmidial

Para obtenção do DNA plasmidial, foi realizada uma midiprep com o kit comercial PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kits, da Invitrogen®. Primeiramente equilibrou-se as colunas, aplicando-se 15ml de *Equilibration Buffer* (EQ1) diretamente ao cartucho da coluna *HiPure Filter Midi* deixando a solução drenar por gravidade e enquanto isso, foi preparado a lise celular das bactérias. Dessa forma, 100ml de cultura foram colocados em dois tubos cônicos de 50ml cada, os quais foram centrifugados à 4000xg por 10 minutos

para coletar as células. Todo o sobrenadante foi removido. O sedimento foi ressuspendido em 10ml de *Resuspension Buffer* (R3) com RNase A, misturando gentilmente o tubo até obter um sedimento homogêneo. A este tubo foram adicionados 10ml de *Lysis Buffer* (L7), homogeneizando gentilmente por inversão. O lisado foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 10ml de *Precipitation Buffer* (N3), sendo imediatamente misturado por inversão até obter mistura homogênea.

Após esta etapa, o precipitado foi colocado na coluna *HiPure Filter Midi*, novamente equilibrada, sendo o conteúdo filtrado por gravidade, durante 10 a 15 minutos ou até diminuição do fluxo de filtração. O líquido foi descartado e o filtro da coluna lavado por gravidade, com 10ml de *Wash Buffer* (W8). O cartucho de filtração interna da coluna foi descartado e a mesma lavada com 20ml de *Wash Buffer* (W8), deixando esta solução passar pela coluna, por gravidade, desprezando o líquido.

Para eluir o DNA plasmidial, um tubo cônico de 15ml foi colocado embaixo da coluna *HiPure Filter Midi*, sendo adicionado 5ml de *Elution Buffer* (E4). O conteúdo eluído foi então precipitado. Para esta etapa foi adicionado 3,5ml de isopropanol, deixando por 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugando por 12000xg por 30 minutos à 4°C, sendo que o sobrenadante resultante foi retirado cuidadosamente para que o sedimento de DNA não fosse removido também. Este foi ressuspendido em 3ml de etanol 70%, procedendo-se nova centrifugação (12000xg, 5 minutos, 4°C) descartando o sobrenadante. O sedimento foi seco em ar, ressuspendido em 100µl de TE. A concentração de DNA foi mensurada em espectrofotômetro com absorbância de 260nm, sendo a qualidade do mesmo determinada pela relação entre as absorbâncias 260/280nm (NANODROP 1000 Spectrophotometer, THERMO SCIENTIFIC®). O DNA plasmidial foi armazenado à -20°C, até o uso.

Experimento 1 - Inibição das endonucleases espermáticas pela adição do ácido aurintricarboxílico após adição de DNA exógeno

5.4 Coleta dos espermatozoides

Os espermatozoides foram coletados diretamente da cauda do epidídimo de 15 camundongos machos com 4 a 6 meses de idade, linhagem BI-6/DBA (F1). Os animais foram primeiramente eutanasiados pelo método de deslocamento cervical. Este método de eutanásia é preconizado na literatura para a colheita de espermatozoides (LASSALE et al., 1999; FURIMSKY et al., 2005), sendo realizado conforme descrito por Hogan et al.(1986).

Após a excisão da pele e a remoção do órgão, foi utilizado protocolo de colheita de espermatozoides adaptado de Yamashiro et al. (2010), no qual a cauda do epidídimo foi colocada em papel absorvente, para remover o excesso de gordura restante após a dissecação. A mesma foi colocada em outro pedaço de papel absorvente, sendo posicionada de modo que a extremidade de maior diâmetro ficasse livre, onde foi realizado corte com auxílio de tesoura. Por compressão digital, os espermatozoides contidos na cauda do epidídimo foram coletados com auxílio de pipeta de vidro siliconizada, com a ponta em forma de gancho, posicionada na extremidade maior da cauda. Assim as pipetas contendo os espermatozoides foram colocadas em microtubo de 1,7ml com 1ml de meio de Fecundação (Fertilization Medium - FM) (Whittingham, 1971 modificado por L. Fraiser e Dury, 1975) (ANEXO B) acrescido de 0,4mg/ml de BSA (Fração V, SIGMA®).

5.5 Ensaio de digestão plasmidial

O ensaio de digestão plasmidial foi realizado conforme descrito por Yamauchi et al. (2007). Para isso, primeiramente um extrato espermático deve ser obtido.

5.5.1 Obtenção do extrato espermático

Para obtenção do extrato espermático, os espermatozoides foram centrifugados a 1000xg por 10 minutos a 4°C, por três vezes consecutivas, sendo sempre o sedimento ressuspensionado em PBS sem Cálcio e Magnésio (GIBCO®). O sedimento resultante da última centrifugação foi ressuspensionado em 0,5ml de PBS sem Cálcio e Magnésio (GIBCO®) e a concentração de espermatozoides foi mensurada com auxílio de câmara de Neubauer, para se obter concentração final de 15×10^6 espermatozoides totais para os ensaios. Assim, os espermatozoides foram novamente centrifugados (1000xg, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em Triton-X PBS 1% (SIGMA® - ANEXO B) e misturado vigorosamente. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a solução foi novamente centrifugada (1000xg, 10 minutos, 4°C), obtendo-se o extrato espermático.

Para verificar a eficiência do protocolo de obtenção do extrato espermático uma alíquota de 12,5µl foi corada com a sonda fluorescente Hoechst 33342 (H342) (ANEXO B), intercalante de DNA em regiões de dupla fita ricas em A-T. Para isso, 1,35µl de H342 foram adicionados a 12,5µl do extrato espermático, completando-se o volume com 86,15µl de PBS sem Cálcio e Magnésio (GIBCO®). Após 8 minutos de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de epifluorescência Olympus IX80 (Tóquio, Japão) com filtro de excitação de 330-385nm e filtro de barreira de 420nm, equipado com câmera OLYMPUS Q-Color™ de 5 megapixels, em magnificação de 200X.

A avaliação foi feita em relação às estruturas íntegras, ou seja, quantidade e presença ou ausência de cabeças de espermatozoides, sendo considerado que a digestão e a obtenção do extrato espermático ocorreram em amostras com menor quantidade ou com ausência de cabeças espermáticas visualizadas (Figura 4).

Figura 4 – Imagem representativa obtida por microscopia de epifluorescência em aumento de 200 vezes. Coloração do extrato espermático com H342 – São Paulo, 2012.

Legenda: Em A) traços de DNA podem ser visualizados e em B) visualizam-se cabeças de espermatozoides.

5.5.2 Incubação do extrato espermático

Para o ensaio de digestão plasmidial, o extrato espermático foi incubado com os plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE 3, na concentração de 1000ng, para cada 1×10^6 espermatozoides. A incubação ocorreu por 1h à 37°C, em banho-maria.

5.5.3 Avaliação do ensaio de digestão plasmidial

Para avaliação do ensaio de digestão plasmidial foi realizada eletroforese em gel de 0,7% de agarose, em TAE (ANEXO B) durante 2 horas, 100mV. Em cada poço foi colocado volume final de 10µl, padronizando-se 40ng de DNA por poço, e o volume equivalente a esta concentração nas amostras que não continham o mesmo, sendo completado com água ultrapura (H₂O MilliQ™) autoclavada. O tampão de corrida utilizado foi o TAE 1X (ANEXO B).

Após corrida o gel foi corado com Brometo de etídeo (Bioagency® - ANEXO B) por 15 a 30 minutos e fotografados sob luz UV (365nm) em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Molecular Imaging System, Carestream Health, Inc.).

5.6 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido com o intuito de verificar a concentração de ATA necessária para inibir a ação das endonucleases espermáticas em murinos. Assim, foi realizado um ensaio de digestão plasmidial, no qual o DNA plasmidial foi submetido à digestão por endonucleases espermáticas. Este ensaio mimetiza a ação das endonucleases contidas no extrato espermático sobre o DNA plasmidial, podendo se estabelecer a melhor concentração do ATA: 10 μ M, 25 μ M ou 50 μ M, necessária para a para inibição desta enzima.

5.6.1 Verificação da inibição do ATA na digestão plasmidial

Após colheita dos espermatozoides (item 5.4) e obtenção do extrato espermático (item 5.5.1) foram realizados os ensaios de digestão plasmidial (item 5.5).

Para este ensaio, o equivalente a 1x10⁶ espermatozoides por grupo foi submetido à digestão plasmidial. Assim os grupos experimentais foram identificados por números para facilitar a compreensão dos mesmos, conforme quadro1.

Quadro 1 - Grupos experimentais do experimento 1

Amostra	Identificação
Ef	1
Ei	2
Ef + plasmídeo	3
Ei + plasmídeo	4
E com plasmídeo	5
ATA10	6
ATA25	7
ATA50	8
C+	9

Legenda: Ef: Extrato fresco, amostra com extrato incubada à temperatura ambiente. Ei: Extrato incubado, amostra com extrato espermático, incubado à 37°C. Ef + plasmídeo: extrato fresco no qual 1000ng dos plasmídeos foram adicionados no momento da eletroforese. Ei + plasmídeo: extrato incubado no qual 1000ng dos plasmídeos foram adicionados no momento da eletroforese. E com plasmídeo: amostra de extrato espermático incubada com 1000ng dos DNAs plasmidiais. ATA 10: amostra de extrato espermático com adição de 1000ng dos plasmídeos e 10µM de ATA. ATA 25: amostra de extrato espermático com adição de 1000ng dos plasmídeos e 25µM de ATA. ATA 50: amostra de extrato espermático com adição de 1000ng dos plasmídeos e 50µM de ATA. C+: amostra de extrato espermático com adição de 1000ng de DNA plasmidial e PBS adicionado de 5µM de cálcio e 5µM de magnésio (controle positivo).

Os mesmos grupos experimentais foram utilizados para o PCX-EGFP e para o pmGENIE3, sendo empregada a mesma identificação.

A quantidade de DNA plasmidial utilizada foi de 1000ng, e o volume final de incubação, para todos os grupos de 60µl. Quando necessário, o volume final foi completado com PBS sem Cálcio e Magnésio (GIBCO®). Os grupos com adição de Cálcio e Magnésio (ANEXO B) foram utilizados como controle positivo do ensaio. Tanto o plasmídeo quanto o extratos espermáticos puros (grupos Ef e Ei), foram utilizados como controle negativo do ensaio. A avaliação da digestão plasmidial foi realizada conforme descrito no item 5.5.1.

Experimento 2 - Eficiência do ATA na inibição de fragmentação de DNA genômico

Para o experimento 2 foi utilizada a construção gênica do plasmídeo pCX-EGFP, conforme já descrito no item 5.1. Para isso, também houve transformação de bactérias, conforme item 5.2 e extração de DNA plasmidial, conforme item 5.3.

5.7 Linearização e precipitação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial obtido após midiprep, foi linearizado com a enzima de restrição HindIII (PROMEGA ®), conforme instruções do fabricante.

Para precipitação do DNA plasmidial foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e três vezes o volume de etanol absoluto, dependendo do volume de plasmídeo utilizado. As amostras permaneceram por 12 horas à -20°C, sendo centrifugadas na máxima rotação (16000xg) por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido e a amostra foi seca em ar. Os sedimentos de DNA foram ressuspensos em 100µl de água ultrapura (SIGMA®) autoclavada, sendo em seguida quantificados em espectrofotômetro utilizando absorbância de 260nm sendo a qualidade do mesmo, determinada pela relação entre as absorbâncias 260/280nm (NANODROP 1000 Spectrophotometer, THERMO SCIENTIFIC®).

5.8 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi de blocos incompletos equilibrados, no qual devido à quantidade reduzida de espermatozóide, cada replicata foi realizada com 3 dos 6 grupos experimentais. Ou seja, para que fosse avaliado 5 replicatas de cada grupo, um total de 10 repetições foi realizado, com 3 grupos experimentais casualizados por vez (n=30). Os grupos experimentais e delineamento podem ser verificados no quadro e figura abaixo (quadro 2, figura5).

Quadro 2- Identificação dos grupos experimentais referentes aos experimentos 2 e 3.

Identificação	Grupo experimental
1	Espermatozoides
2	Espermatozoides + ATA
3	Espermatozoides + PCX-EGFP 500ng
4	Espermatozoides + PCX-EGFP 500ng + ATA
5	Espermatozoides + PCX-EGFP 1000ng
6	Espermatozoides + PCX-EGFP 1000ng + ATA

Figura 5. Delineamento Experimental utilizado nos experimentos 2 e 3.

Legenda: blocos experimentais representados na primeira coluna e grupos experimentais utilizados em cada bloco representados na segunda coluna.

Foram adotados dois tratamentos: presença ou ausência do ácido aurintricarboxílico e 500 ou 1000ng, de DNA plasmidial e respectivos controles, totalizando-se 6 grupos experimentais.

5.8.1 Colheita dos espermatozoides

Os espermatozoides foram colhidos diretamente da cauda do epidídimo de 10 camundongos machos, com de 3 a 8 dias de abstinência sexual, conforme descrito no item 5.4, sendo colocados em microtubos de 1,7ml com 0,5ml de meio HTF (MiliporeTM).

5.8.2 Incubações

Após colheita, os espermatozoides permaneceram por 5 minutos em estufa com 5% de CO₂ em ar para promover desaglutinação. Após este período, foi verificada a motilidade e mensurada a concentração. Para cada grupo experimental foi utilizada a concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides totais. Estes foram incubados inicialmente por 30 minutos na presença ou ausência do ATA e por mais 30 minutos com presença ou ausência do PCX-EGFP. Todas as incubações foram realizadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂ em ar, seguindo os padrões de incubação da técnica de TGME.

Para garantir a atividade da endonuclease no DNA endógeno, além do desafio com diferentes concentrações de DNA plasmidial, optou-se por incubar as células espermáticas por 5 horas consecutivas, já que este período é o máximo necessário para que fragmentos de DNA genômico sejam liberados do espermatozoide (MAIONE et al., 1997)

5.8.3 Detecção da ação do ATA sobre as endonucleases espermáticas

Para verificar se a adição do ATA previne a fragmentação do DNA endógeno foi utilizado o teste de susceptibilidade da cromatina espermática à denaturação ácida (SCDA), adaptado de Evenson et al. (1980), e o ensaio Cometa Alcalino, adaptado de Donnelly et al. (2000) e Evenson e Wixon (2006).

5.8.3.1 Teste de susceptibilidade da cromatina espermática à denaturação ácida (SCDA)

O SCDA determina a suscetibilidade do espermatozoide em sofrer fragmentação de DNA, quando este é exposto a um desafio ácido. Esta susceptibilidade à fragmentação do DNA genômico é detectada pelo fluoróforo laranja de acridina, que fluoresce em vermelho quando associado ao DNA fragmentado e em verde na presença de dupla fita de DNA (DNA íntegro), sendo avaliado pela técnica de citometria de fluxo em capilar (Guava EasyCyte™ Mini System).

O teste de susceptibilidade da cromatina espermática à denaturação ácida (SCDA) foi adaptado do protocolo descrito por BoeHansen et al. (2005).

De cada amostra foram utilizadas 200.000 células, onde em sala escura, procedeu-se à centrifugação por 1 minuto em micro centrífuga para a retirada do meio e consequentemente a influência deste. Assim, as células foram ressuspendidas em 50µL de tampão TNE (ANEXO C), acrescido de 100µl de detergente ácido. Após 30 segundos, 300µl de solução de laranja de acridina (ANEXO C) foram acrescentados e as células, incubadas por 3-5 minutos.

Após a incubação as células foram avaliadas em citômetro de capilar Guava EasyCyte™ Mini System (Guava™ Technologies) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A validação do SCDA encontra-se descrita no apêndice A.

5.8.3.2 Ensaio de cometa alcalino

O Ensaio Cometa Alcalino é um teste que possibilita avaliar a fragmentação de fita simples do DNA de célula única. Após fixação das células em matriz de gel em lâmina de microscopia, procede-se a lise das membranas celulares, a descompactação do DNA espermático e a separação da dupla fita. Quando estas lâminas são submetidas a uma corrente elétrica, os fragmentos de DNA migram pela matriz gel, formando a cauda do cometa, enquanto que quando o DNA está íntegro, devido ao seu tamanho, este não migra pelo gel e permanece junto a cabeça do espermatozoide formando a cabeça do cometa.

O protocolo utilizado foi adaptado de Donnelly et al (2000) e as soluções utilizadas encontram-se descritas no anexo D.

Lâminas de microscopia foram previamente preparadas com uma fina camada (1ml) de agarose normal melting (NM) 1% em TBE, e deixadas secar em temperatura ambiente. Sobre a camada de agarose NM seca foram adicionados 100µl de sêmen diluído (125.000 espermatozoides/ml) em 0,75% de agarose low melting (LM) em TBE e coberto por lamínula.

As lâminas foram acondicionadas à 4°C por 3 à 5 minutos, para solidificação do gel. Após a solidificação, a lamínula foi cuidadosamente removida, sendo acrescidos mais 300 µl de agarose LM, e esta novamente coberta com lamínula e acondicionada à 4°C, para solidificação do gel.

Posteriormente à solidificação, a lamínula foi novamente retirada, sendo adicionado 1ml da solução de lise I, na qual as amostras foram incubadas em câmara úmida a 55°C, por 1 hora.

Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem, utilizando-se uma piceta com água ultrapura (H₂O MilliQTM) para a remoção da solução de lise I. Em seguida, 1mL de solução de lise II foi acrescentado, sendo as amostras incubadas por mais 1 hora em câmara úmida a 55°C.

As lâminas foram novamente lavadas com uma piceta com água ultrapura (H₂O MilliQTM) para a remoção da solução de lise II, sendo então adicionado 1ml de solução de lise III. As lâminas foram então acondicionadas à 4°C, por duas horas.

Após as etapas de lise, as lâminas foram lavadas, posicionadas na cuba de eletroforese e imersas na solução de corrida gelada (ANEXO D) e mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos. A eletroforese foi realizada a 1,8V/cm e amperagem máxima de 270 mA, por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com TBE, desidratadas com álcool absoluto, e secas a temperatura ambiente.

No dia da leitura, as lâminas foram reidratadas com água ultrapura por uma hora e coradas com 1ml de Syber Green (ANEXO D) diluído 10.000X, também por uma hora em câmara escura. Ao término deste período, as lâminas foram lavadas com água ultrapura, secas e cobertas por lamínulas.

As imagens foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Olympus IX80 (Tóquio, Japão) com filtro de excitação de 420-480nm e filtro de barreira de 475nm, equipado com câmera OLYMPUS Q-ColorTM de 5 megapixels, em magnificação de 200X. As imagens de 100 células foram selecionadas aleatoriamente e analisadas com o software de imagens Comet ScoreTM, disponibilizado gratuitamente na internet pela empresa Tritex-Corp ([http:// autocomet.com/products_cometscore.php](http://autocomet.com/products_cometscore.php)).

O programa fornece um quadro de mensuração retangular para a avaliação dos cometas. As células foram avaliadas quanto às variáveis: comprimento do cometa, altura do cometa, área do cometa, intensidade do cometa, intensidade média do cometa, diâmetro da cabeça, área da cabeça, intensidade da cabeça, intensidade média da cabeça, porcentagem de DNA na cabeça, comprimento da cauda, área da cauda, intensidade da cauda, intensidade média da cauda, porcentagem de DNA na cauda, *olive moment* e momento da cauda de cometa (quadro 3). Os resultados foram dados em *pixels* (px) e porcentagem.

Quadro 3- Variáveis obtidas na análise do ensaio de cometa alcalino pelo software Comet ScoreTM e suas definições

Variáveis	Definição
Comprimento do cometa	Número de pixels na direção horizontal do cometa.
Altura do cometa	Número de pixels na direção vertical do cometa.
Área do cometa	Número de pixels no cometa.
Intensidade do cometa	Soma dos valores da intensidade de pixels no cometa.
Intensidade média do cometa	Média da intensidade de pixels no cometa.
Diâmetro da cabeça	Número de pixels na direção horizontal do cometa.
Área da cabeça	Número de pixels na cabeça.
Intensidade da cabeça	Soma dos valores da intensidade de pixels na cabeça do cometa.
Intensidade média da cabeça	Média da intensidade de pixels na cabeça do cometa.
Porcentagem de DNA na cabeça	Intensidade total da cabeça dividida pela intensidade total do cometa multiplicado por 100.
Comprimento da cauda	Diâmetro da cabeça subtraído do comprimento do cometa
Área da cauda	Número de pixels na cauda do cometa
Intensidade da cauda	Soma dos valores de pixels na cauda do cometa
Intensidade média da cauda	Média de intensidade de pixels na cauda do cometa
Porcentagem de DNA na cauda	Intensidade total da cauda dividida pela intensidade total do cometa multiplicado por 100.
Momento da cauda de cometa	Porcentagem de DNA multiplicado pelo comprimento da cauda do cometa
<i>Olive moment</i>	Soma dos valores de intensidade da cauda multiplicados por suas distâncias relativas ao centro da cabeça, dividido pela Intensidade total.

Experimento 3 - Detecção dos índices de internalização após o uso de ATA

A construção gênica utilizada foi o plasmídeo pCX-EGFP, conforme já descrito no item 5.1.

Para isso, também houve transformação de bactérias, conforme item 5.2, extração de DNA plasmidial, conforme item 5.3, linearização e precipitação do DNA plasmidial conforme previamente descrito no item 5.7.

5.9 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o mesmo do experimento 2: Blocos Incompletos Equilibrados (Figura 5), no qual cada replicata foi formada por 3 grupos experimentais, totalizando-se 10 replicatas com 5 repetições de cada grupo.

A colheita dos espermatozoides e as incubações foram realizadas conforme descrito no item 5.4 e 5.8.2.

Para que todo DNA plasmidial não internalizado à célula espermática fosse removido após incubação, os espermatozoides foram centrifugados a 9000 X g por 3 minutos, ressuspendidos em 200µl de PBS sem cálcio e magnésio (GIBCO®), centrifugados novamente (9000 X g/3 minutos) e ressuspendidos em solução de DNase I (4U para 1×10^6 espermatozoides totais), e incubados à 37°C em banho-maria por 30 minutos. Assim foram centrifugados novamente (9000 X g/3 minutos), ressuspendidos em 200µl de PBS sem cálcio e magnésio (GIBCO®), centrifugados (9000 X g/3 minutos) e o sedimento congelado à -80°C.

5.9.1 Extração de DNA espermático

Para extração do DNA genômico das células espermáticas, as amostras foram primeiramente congeladas e descongeladas diretamente em nitrogênio líquido, por cinco vezes consecutivas, o que permitiu a quebra da membrana plasmática. Após a lise foram adicionados a cada amostra 37,5µl de acetato de sódio 0,2M; 5µl de SDS 10% e 1µl de

proteínase K, com vigorosa agitação, seguida de incubação à 56°C por 2 h em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®).

Após a incubação, em cada amostra foram adicionados 40µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, sendo estas agitadas e submetidas à centrifugação de 16000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e colocado em tubo cônico de 1,5ml. À porção aquosa do sobrenadante foram adicionados 100µl de isopropanol gelado, sendo este misturado, por inversão do tubo e centrifugado novamente (16000 x g por 2 minutos). O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo, sendo adicionado 50µl de álcool etílico 70%, seguido de centrifugação (16000 x g por 2 minutos). O sobrenadante foi removido por inversão do tubo e o sedimento foi seco em banho-maria à 56°C. As amostras foram eluídas em TE (ANEXO E) aquecido à 56°C, sendo em seguida incubadas por 1 hora em banho-maria também à 56°C. O material foi homogeneizado e quantificado no espectrofotômetro com absorbância de 260nm, conforme descrito no item 5.7. As amostras foram então diluídas para a concentração final de 1ng/µl e armazenados à -20°C, quando não utilizadas imediatamente.

Para evitar contaminação entre amostras com ou sem DNA exógeno, as extrações foram realizadas separadamente em duas frentes. Na primeira realizou extração apenas das amostras com ausência de DNA plasmidial e na segunda apenas as amostras que foram incubadas com DNA plasmidial.

5.9.2 Detecção dos índices de transfecção por PCR em tempo real

Para verificar a quantidade de DNA plasmidial associado aos espermatozoides foi utilizado a PCR de quantificação absoluta em tempo real (qPCR - Mastercycler ep Realplex (Eppendorf®).

Para cada amostra foram realizadas triplicatas da reação de PCR em tempo real de quantificação absoluta, cada reação contendo: 2µl de DNA genômico, 5µl de SyberGreenER™qPCR Supermix Universal (Invitrogen®), 5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (0,28µl) e 2,44µl de água ultra-pura (SIGMA®). Para cada reação de qPCR realizou-se um controle negativo (todos os reagentes presentes em uma reação, sendo o volume relativo ao DNA substituído por água ultra-pura).

O plasmídeo PCX-EGFP foi utilizado como amostra para análise da curva padrão nas concentrações de 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002; 0,00002; 0,000002; 0,0000002ng (apêndice B).

Todas as reações foram submetidas às seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de: 95°C por 15 segundos, 64°C por 15 segundos e 68°C por 20 segundos. As amostras foram então aquecidas à 95°C por 15 segundos, resfriadas à 60°C por 15 segundos sendo então realizada curva de dissociação de 60 à 95°C, durante 20 minutos (Figura 6).

Figura 6 – Descrição gráfica da relação temperatura pelo tempo da reação de qPCR - São Paulo 2012.

Legenda: Passo 1 e 2 correspondem à desnaturação do DNA e ativação DNA polimerase. Passos de 3 a 5 correspondem ao ciclo da reação, o qual foi repetido por 45 vezes. Passos de 6 a 8 correspondem a curva de dissociação.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram sintetizados de acordo com a sequência utilizada por Feitosa et al.(2010) (quadro 4)

Quadro 4- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR de quantificação absoluta em tempo real

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência de bases
Senso	ATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
Anti senso	TGCCGTCCTCGATGTTGTG

Devido as quantidades de amostra (90 amostras experimentais relativas às triplicatas de reações e, 21 amostras relativas à curva padrão) e dado a capacidade do equipamento (96 reações por rodada) foram realizadas duas corridas de qPCR, com curva padrão em ambas.

A quantidade de DNA plasmidial em cada grupo experimental foi avaliada mediante estimativa da eficiência de amplificação (*Ct Mean*), comparada e normalizada pela equação de reta obtida com a curva padrão do plasmídeos.

5.10 Análise Estatística

Experimento 1:

Para análise dos dados experimentais procedeu-se a uma avaliação em escala de cruces (1 a 3), no qual 1 foi atribuído à digestão total e 3 à não digestão do DNA plasmidial.

Os resultados foram analisados pelo programa SAS 9.2 pelo procedimento NPAR1WAY para verificar efeito dos tratamentos nas variáveis não paramétricas de ordem. Para tanto, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Tendo as variáveis atingido um nível de significância desejado ($\alpha=0,05$), estas foram analisadas pelo teste de Wilcoxon sendo comparadas duas a duas.

Experimento 2:

A análise estatística foi realizada pelo programa *SAS system for Windows* versão 9.2, no qual os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Quando as premissas estatísticas não foram obedecidas, os dados foram transformados. Os dados que sofreram transformações e as respectivas transformações aritméticas, podem ser observados no quadro 5.

Quadro 5 – Variáveis transformadas aritmeticamente para cumprimento das premissas estatísticas

Variável	Transformação
Comprimento do cometa	1/ (comprimento do cometa)
<i>Olive moment</i> do cometa	$\log_{10}(\textit{olive moment})$
Área da cauda do cometa	$\log_{10}(\text{área da cauda do cometa})$
Intensidade da cauda do cometa	$\log_{10}(\text{intensidade da cauda do cometa})$
Intensidade média da cauda do cometa	1/ (intensidade média do cometa)
Comprimento da cauda do cometa	$\log_{10}(\text{comprimento da cauda do cometa})$
Momento da cauda do cometa	$\log_{10}(\text{Momento da cauda do cometa})$
Células positivas ao SCDA	$\log_{10}(\text{Células positivas ao SCDA})$

Foi realizada análise de variância (PROC GLM) e comparação das médias utilizando o TUKEY como teste. Foi empregado nível de significância de 0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade.

Experimento 3:

A análise estatística foi realizada pelo programa *SAS system for Windows* versão 9.2, no qual os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Quando as premissas estatísticas não foram obedecidas, estes foram transformados para logaritmo na base dez para que a distribuição fosse normal.

Neste realizou-se também análise de variância (PROC GLM) e a comparação das médias utilizando o TUKEY como teste (nível de significância de 0,05).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Experimento 1:

Os resultados estão apresentados na tabela e gráficos a seguir (Tabela 1, Gráfico 1 e 2 e Figura 7).

Tabela 1 - Mediana e quartis superior (Q1) e inferior (Q3) dos plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE3 em cada um dos 9 grupos experimentais – São Paulo, 2011.

Grupo	Mediana PCX-EGFP	(Q1; Q3) PCX-EGFP	Mediana pmGENIE3	(Q1; Q3) pmGENIE3
1	1 ^d	(1; 1)	1 ^{c,d}	(1; 1)
2	1 ^d	(1; 1)	1 ^d	(1; 1)
3	3 ^{a,b}	(2; 3)	1 ^{c,d}	(1; 2)
4	3 ^a	(3; 3)	1 ^d	(1; 1)
5	3 ^{c,d}	(3; 3)	1 ^{b,c}	(1; 1)
6	2 ^{a,b}	(2; 3)	2 ^{b,c}	(2; 2)
7	3 ^{a,b}	(3; 3)	3 ^{a,b}	(2; 3)
8	3 ^{a,b}	(3; 3)	3 ^a	(3; 3)
9	2 ^{b,c}	(2; 2)	2 ^c	(2; 2)

* Letras diferentes significam diferença significativa, $p < 0,05$, entre os grupos para cada plasmídeo.

Gráfico 1- Mediana da escala de cruzes da digestão do PCX-EGFP nos diferentes grupos experimentais - São Paulo, 2011.

Letras diferentes significam diferença estatística significativa, $p < 0,05$.

Gráfico 2- Mediana da escala de cruzes na digestão do pmGENIE3 nos diferentes grupos experimentais . - São Paulo, 2011.

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($\alpha=0,05$)

Ao se comparar os padrões de digestão dos plasmídeos PCX-EGFP e pmGENIE3 entre os grupos experimentais 1 (extrato fresco) e o 2 (extrato incubado) (quadro 1) não houve diferença ($p > 0,05$), comprovando serem bons controles negativos do ensaio (tabela1, gráficos

1 e 2). O mesmo ocorreu entre os grupos 3 (extrato fresco+ plasmídeo) e 4 (extrato fresco+ plasmídeo).

Para o PCX-EGFP, os grupos 5 e 6 apresentaram diferença entre si, demonstrando que a presença de ATA na concentração de 10 μ M alterou o padrão de digestão do pCX-EGFP.

A comparação entre os grupos com 25 μ M (grupo 7) e com 50 μ M (grupo 8) e o grupo sem ATA (grupo 5) demonstrou diferença em ambos os plasmídeos, PCX-EGFP e pmGENIE-3. Isso demonstra que o ácido aurintricarboxílico tanto na concentração de 25 μ M como na concentração de 50 μ M, causa alguma inibição da digestão dos plasmídeos.

Para o plasmídeo PCX-EGFP, as três concentrações de ATA não apresentaram diferença, parecendo inibir a ação das endonucleases. Já para o pmGENIE-3 apenas as concentrações de 25 μ M e 50 μ M não demonstram diferenças.

Ao se comparar as digestões dos plasmídeos pmGENIE-3 e do PCX-EGFP, os resultados demonstram que o plasmídeo pmGENIE-3 comportou-se de maneira diferente quanto a sua digestão apresentando maior fragilidade ao extrato espermático.

A concentração de ATA nas quais se notou o padrão 3 (inibição total da digestão) foi visualizada nas medianas do grupo 7 (25 μ M) e 8 (50 μ M), para os dois plasmídeos, sendo que para o pmGENIE3, os quartis superiores e inferiores não seguiram a mesma distribuição do grupo 7 (Tabela1), apenas do grupo 8. Assim, optou-se por utilizar a concentração de 50 μ M no experimento 2 e, devido à sensibilidade do pmGENIE3 ao extrato espermático, tendo-se evidência de digestão parcial em algumas replicatas, mesmo com a mistura a fresco (sem incubação prévia) no momento da eletroforese, optou-se pelo uso do PCX-EGFP como vetor plasmidial.

Figura 7 – Foto de gel do ensaio de digestão plasmidial (replicata 2)- São Paulo 2012.

Legenda: _Marcador: Marcador de peso molecular, Ef: extrato fresco; Ei: extrato incubado, Ef+PCXc: extrato fresco+ PCX-EGFP circular; Ei+PCXc: extrato fresco+ PCX-EGFP circular, EPC: extrato incubado com PCX-EGFP circular, ATA 10P: extrato incubado com PCX-EGFP circular a ATA na concentração de 10 μ M, ATA25P: extrato incubado com PCX-EGFP circular a ATA na concentração de 25 μ M; ATA 50P: extrato incubado com PCX-EGFP circular a ATA na concentração de 50 μ M, C+ P: controle positivo do PCX-EGFP, PCXc:PCX-EGFP circular, Ef + RFP: extrato fresco + pmGENIE3, Ei + RFP: extrato incubado + pmGENIE3, Erc: extrato incubado com pmGENIE3, ATA 10R: extrato incubado com pmGENIE3 circular e ATA na concentração de 10 μ M, ATA 25R: extrato incubado com pmGENIE3 circular e ATA na concentração de 25 μ M, ATA 50R: extrato incubado com pmGENIE3 circular e ATA na concentração de 50 μ M, C+ P: controle positivo do pmGENIE3; RFP: pmGENIE3 circular.

Experimento 2:

Os resultados do experimento 2 estão sumarizados na tabela 2, na qual está descrito as médias, os respectivos erros padrões e valor de p, tanto para os grupos experimentais quanto para os animais (blocos).

Tabela 2- Características avaliadas pelo teste cometa alcalino e porcentagem de células positivas ao SCDA- São Paulo, 2012.

Parâmetro	1	2	3	4	5	6	P valor	
							Tratamento	Animal
Comprimento do cometa	167,90 ± 10,18	162,61 ± 3,63	180,54 ± 18,36	131,74 ± 4,07	151,96 ± 2,84	165,68 ± 10,46	0,020	0,261
Altura do cometa	113,31 ± 8,72	122,47 ± 4,97	115,00 ± 1,67	104,26 ± 3,66	121,54 ± 1,34	120,20 ± 4,98	0,060	0,146
Área do cometa	15785,25 ± 2240,96	15959,03 ± 906,76	16626,98 ± 1586,83	11463,24 ± 392,99	15586,24 ± 590,89	16087,77 ± 1041,78	0,090	0,269
Intensidade do Cometa	380419,41 ± 42749,14	409742,26 ± 27311,60	412062,52 ± 10053,37	323674,88 ± 31606,55	404671,69 ± 38957,41	438614,60 ± 26012,64	0,082	0,062
Intensidade média do cometa	27,21 ± 3,29	26,98 ± 0,82	27,51 ± 1,97	29,82 ± 2,42	27,00 ± 1,29	28,23 ± 1,00	0,712	0,037
Diâmetro da cabeça do cometa	85,53 ± 4,72	97,56 ± 3,88	90,11 ± 0,99	92,09 ± 3,15	101,06 ± 2,16	97,01 ± 4,90	0,044	0,208
Área da cabeça do cometa	8200,98 ± 1337,89	9999,59 ± 629,15	9095,74 ± 1074,86	8516,96 ± 931,81	11294,60 ± 868,04	10027,62 ± 901,38	0,271	0,425
Intensidade da cabeça do cometa	238136,84 ± 23103,62	282069,13 ± 17146,79	269889,80 ± 10086,01	268433,29 ± 37286,85	309821,74 ± 33851,22	304806,32 ± 19259,53	0,147	0,039
Intensidade média da cabeça do cometa	31,93 ± 3,61	29,39 ± 0,81	32,43 ± 2,50	32,56 ± 1,75	28,39 ± 1,20	31,55 ± 1,30	0,331	0,068
Porcentagem de DNA na cabeça do cometa	69,21 ± 3,55	74,04 ± 1,37	71,02 ± 3,73	85,61 ± 3,41	79,41 ± 1,46	72,94 ± 3,32	0,010	0,237
Comprimento da cauda do cometa	82,38 ± 5,54	65,05 ± 4,51	90,42 ± 19,05	39,65 ± 7,14	50,89 ± 3,73	68,66 ± 12,31	0,013	0,33
Área da cauda do cometa	7584,26 ± 988,33	5959,44 ± 344,62	7531,23 ± 1324,45	2946,29 ± 617,78	4291,64 ± 316,07	6060,15 ± 1142,71	0,004	0,428
Intensidade da cauda do cometa	142282,57 ± 21621,90	127673,13 ± 12405,48	142172,72 ± 18613,97	55241,59 ± 5778,17	94849,95 ± 7792,19	133808,29 ± 21562,93	0,001	0,371
Intensidade média da cauda do cometa	15,60 ± 2,06	544,18 ± 526,62	79,30 ± 63,18	87,63 ± 71,42	34,65 ± 17,34	22,43 ± 3,89	0,919	0,792
Porcentagem de DNA na cauda do cometa	30,79 ± 3,55	25,95 ± 1,37	28,97 ± 3,73	14,38 ± 3,41	20,58 ± 1,46	27,05 ± 3,3299934	0,010	0,237
Momento da cauda do cometa	33,98 ± 1,92	24,78 ± 2,92	38,18 ± 12,08	10,13 ± 3,1471955	15,08 ± 1,97	24,59 ± 6,80	0,006	0,38
Olive Moment	25,67 ± 1,75	20,46 ± 1,86	29,62 ± 8,81	9,61 ± 2,45	13,88 ± 1,14	20,31 ± 3,98	0,006	0,348
Células positivas ao SCDA	2,50 ± 0,81	28,88 ± 7,98	1,82 ± 0,30	43,42 ± 16,66	2,3440000 ± 0,78	32,44 ± 6,91	<0,0001	0,201

Os gráficos de SCDA e as fotos do ensaio de cometa alcalino podem ser visualizadas a seguir (Figura 8 e 9) juntamente com os parâmetros quantificados pelo software Comet Score™ (Figuras 10 e 11).

Figura 8 – Histogramas gerados pelo software Flow Jo 9.4.11, relativos a análise do SCDA – São Paulo, 2011.

Legenda: 1: Grupo experimental 1, 2: Grupo experimental 2, 3: Grupo experimental 3, 4: Grupo experimental 4, 5: Grupo experimental 5, 6: Grupo experimental 6.

Figura 9 - Microscopia de epifluorescência do ensaio cometa alcalino - São Paulo – 2012.

Legenda: A: espermatozoides com DNA íntegro (ausência de cauda e cabeça intensa); B: espermatozoides com cauda de cometa - (Aumento de 200X; coloração sonda fluorescente Syber Green).

Figura 10- Imagem ilustrativa dos parâmetros quantificados pelo software Comet Score™.- São Paulo 2012.

As variáveis relativas ao ensaio de cometa alcalino, em sua maioria, têm relação direta com a fragmentação de DNA genômico e espermático. Isto se dá principalmente em relação aos parâmetros da cauda de cometa, já que os parâmetros relativos ao cometa como um todo também mensuram a cabeça, cujo DNA não está fragmentado.

Para o parâmetro comprimento de cometa, o tratamento com 500ng de DNA exógeno e ATA (grupo 4) apresentou média em *pixels* de 131,74, a qual não diferiu dos grupos 2, 5 e 6, diferindo dos grupos 1 e 3 (Gráfico 3). A média dos grupos 1 e 3 foram: 167,9 e 180,54, respectivamente, indicando que o uso do ATA diminuiu o comprimento total do cometa.

Gráfico 3 – Comprimento do cometa (px) - São Paulo 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média do comprimento do cometa em pixels. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A porcentagem de DNA na cabeça do cometa é um parâmetro relativo de mensuração de DNA não fragmentado. Nesta o grupo experimental 4 diferiu dos grupos 1, 3 e 6, apresentando média de 85,61%. A menor porcentagem de DNA na cabeça do cometa foi do grupo 1 (média 69,21%), seguido pelo grupo 3 (média 71,02%), e 6 (média 72,94%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Porcentagem (%) de DNA na cabeça de cometa - São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média de % de DNA na cabeça de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variável porcentagem de DNA na cauda do cometa, mensura diretamente a porcentagem de fragmentação de DNA espermático. A menor média foi apresentada pelo

grupo 4 (14,38%), o qual diferiu dos grupos experimentais 1, 3 e 6. O gráfico 5 demonstra que o grupo com maior porcentagem de fragmentação de DNA foi o 1 (30,79%), seguido pelo grupo 3 (28,97%) e pelo grupo 6 (27,05%).

As variáveis porcentagem de DNA na cabeça e porcentagem de DNA na cauda são complementares, e seus resultados demonstraram que espermatozoides incubados com 500ng de DNA e o ATA diferiram dos grupos de incubação sem DNA exógeno e sem ATA, como também dos incubados com 1000ng de DNA e ATA, quando da avaliação pelo teste cometa alcalino.

Gráfico 5 - Porcentagem (%) de DNA na cauda de cometa - São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média de % de DNA na cauda de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Gráfico 6- Comprimento da cauda de cometa (px) -São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média de comprimento da cauda de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

O comprimento da cauda de cometa mensura diretamente o quanto os pedaços de DNA fragmentados conseguiram correr durante a eletroforese, sendo os maiores comprimentos relativos às partículas que tiveram maior distância na corrida, podendo até mesmo representar os fragmentos de menor tamanho.

O comprimento da cauda do cometa apresentou diferença entre os grupos 1 e 3 em comparação ao grupo 4 (Gráfico 6). As médias representadas na tabela 2 sugerem que o grupo com espermatozoides apenas (1) apresentou maior extensão da cauda de cometa, tendo, portanto maior fragmentação de DNA, e o grupo no qual usou-se 500ng da plasmídeo e ATA apresentou menor extensão da cauda, sendo o grupo de menor índice de fragmentação.

Os resultados obtidos com a variável diâmetro da cabeça do cometa, demonstram que houve uma diferença no tamanho da cabeça do cometa, diferindo entre os grupos experimentais 1 e 5. O grupo 1 apresentou média de 85,53px enquanto que o grupo 5 apresentou média de 101,06px. Isto demonstra que a incubação de espermatozoides murinos provoca um aumento no diâmetro da cabeça quando da incubação com 1000ng de DNA (gráfico 7).

Gráfico 7 - Diâmetro da cabeça de cometa (px) – São Paulo 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média do diâmetro da cabeça de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Na variável área de cauda de cometa, o grupo 4 diferiu dos grupos 1, 2, 3 e 6 ($p=0,03$), não diferindo apenas do grupo 5 (tabela 2). A menor área média foi apresentada pelo tratamento 4 (2946,29), sendo a maior apresentada pelo grupo 1 (7584,26) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Área da cauda de cometa (px) – São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média da área da cauda de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Na variável intensidade da cauda do cometa, o tratamento 4 diferiu de todos os outros grupos experimentais com exceção do 5. O grupo experimental com uso de 500ng de

plasmídeo e ATA (grupo 4) teve a menor intensidade de cauda de cometa, seguido pelo grupo o qual foi utilizado 1000ng de plasmídeo (grupo 5). Ao invés disso, os grupos sem adição de DNA exógeno ou ATA (grupo 1), com adição de apenas ATA (grupo 2), com adição de 500ng de plasmídeo (grupo 3) e com adição de 1000ng de plasmídeo (grupo 6) apresentaram maior intensidade de cauda de cometa, indicando maior fragmentação.

Gráfico 9 – Intensidade da cauda de cometa (px) - São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média da intensidade da cauda de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

O momento de cauda de cometa também apresentou diferença, sendo o tratamento 4 diferente dos grupos experimentais 1, 2 e 3 (Gráfico 10). O momento da cauda do cometa é uma variável relativa que incorpora medidas tanto de DNAs migratórios de tamanhos menores quanto da quantidade de pedaços de DNA fragmentados (<http://www.cometassayindia.org/definitions.htm>). Assim, espermatozoide de camundongos quando incubados com 500ng de DNA exógeno e ATA apresentaram menores quantidades de quebras de DNA em relação aos espermatozoides apenas incubados; incubados com ATA ou incubados com 500ng de PCX-EGFP.

Gráfico 10 - Momento da cauda de cometa - São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média do momento da cauda de cometa. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variável *olive moment* (quadro 5) consiste na soma dos valores de intensidade da cauda multiplicados por suas distâncias relativas ao centro da cabeça, dividido pela intensidade total. Esta demonstrou diferenças entre os grupos experimentais 1, 2 e 3 com o grupo 4. O grupo 4 foi o que apresentou a menor média (9,61%), sendo o grupo 3 o de maior média (29,62%) (tabela 2). Estes dados podem ser visualizados no gráfico 11.

Gráfico 11 - Olive moment- São Paulo, 2012.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a média do *olive moment*. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Assim, fazendo-se uma compilação dos resultados do ensaio de cometa alcalino pode-se concluir que o grupo 4 apresentou uma diminuição da quantidade de quebras de DNA sempre diferindo dos demais grupos, demonstrando-se que 500ng de DNA e 50 μ M de ATA, para a TGME em camundongos, parece inibir a fragmentação de DNA exógeno.

Os resultados relativos ao teste SCDA demonstraram que os grupos com o uso de ATA tiveram maiores médias de susceptibilidade de fragmentação de DNA genômico (Tabela 2) apresentando diferença em relação aos grupos sem a presença do ATA, independente da concentração de plasmídeo utilizada (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Gráfico de colunas para a variável: células positivas ao SCDA - São Paulo, 2011.

Legenda: O eixo da abscissa representa os grupos experimentais e o eixo da ordenada representa a porcentagem de células positivas ao SCDA. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Experimento 3:

A quantificação do DNA exógeno incorporado aos espermatozoides submetidos aos diferentes grupos experimentais apresentou grande variação, sendo que a maior quantidade incorporada foi de 2,09E-03, no grupo 3, seguida de 1,02E-03 no grupo 5 (tabela 3).

Tabela 3- Resultados da análise estatística do Experimento 3 - São Paulo, 2011.

Tratamento	Média de Ct $\pm$ Erro Padrão
1	2,76E-07 $\pm$ 1,49E+00 ^c
2	2,42E-07 $\pm$ 8,50E+00 ^c
3	2,09E-03 $\pm$ 1,44E-03 ^a
4	1,43E-05 $\pm$ 4,10E-06 ^b
5	1,02E-03 $\pm$ 5,82E-04 ^a
6	1,44E-05 $\pm$ 6,90E-06 ^b

Legenda: As médias e erros padrões de cada tratamento são representados. Letras diferentes significam diferença significativa, $p < 0,05$. E: formato de exibição do número em notação exponencial substituindo parte do número por E+n, onde E (para expoente) multiplica o número precedente por 10 à enésima potência.

Os grupos 4 e 6, que foram incubados com plasmídeo e ATA apresentaram resultados diferentes em relação aos grupos que também foram incubados com DNA exógeno sem ATA (3 e 5). Para o grupo 4, a média de incorporação foi de 1,43E-05 e para o grupo 6 foi de 1,44E-05, já para os grupos 3 (2,09E-03) e 5 (1,02E-03) esta foi maior (Tabela 3).

Verificou-se, assim, um efeito negativo do uso do ATA na incorporação de DNA plasmidial PCX-EGFP em espermatozoides murinos.

Os grupos com diferentes concentrações de DNA plasmidial (500 e 1000ng) não apresentaram diferença ($p > 0,05$), indicando que a utilização do dobro da concentração de PCX-EGFP não aumentou a eficiência de incorporação de DNA exógeno na célula espermática.

A amplificação do DNA plasmidial pode ser visualizada na figura 12.

Figura 12 Ilustração da quantificação absoluta do PCX-EGFP em cada tratamento – São Paulo, 2011.

Legenda: *am* significa o tratamento (de 1 a 6) e *rep* significa a replicata em que o mesmo foi realizado, sendo aqui representadas triplicatas de cada um dos grupos experimentais. Letras maiúsculas seguidas por número representam o posicionamento da amostra no equipamento.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O experimento 1 permitiu conhecer o potencial de inibição do ácido aurintricarboxílico (ATA) frente às endonucleases presentes no extrato espermático, comparando-se diferentes concentrações e ação em dois plasmídeos diferentes.

As endonucleases espermáticas quando ativadas tem a habilidade de degradar tanto DNA exógeno quanto cromossomal (SCIAMANNA et al., 2000), por isso optou-se pelo plasmídeo como alvo para ação destas endonucleases, sendo de maior simplicidade em padrões conformacionais e estruturais, o que facilita a observação da resposta esperada.

O uso de dois plasmídeos diferentes teve como objetivo maior evidência da concentração de ATA necessária para inibição da degradação de DNA e também, verificar se a atividade de endonucleases espermáticas se dá da mesma forma em diferentes moléculas de DNA. Os resultados demonstram que para cada um dos plasmídeos tanto a degradação plasmidial quanto a concentração de ATA para inibi-los foi diferente.

Embora o pmGENIE3 tenha maior sensibilidade ao extrato espermático, sendo degradado facilmente; o PCX-EGFP parece ser mais susceptível à inibição de degradação pelo ATA, pois não teve diferença já na concentração de 10 μ M.

Uma explicação possível é devido às diferenças conformacionais entre o PCX-EGFP e o pmGENIE. No entanto, pelo fato dos dois plasmídeos estarem na forma circular, esta explicação parece não se justificar. Um outra explicação recai sobre a quantidade de pares de bases, já que o primeiro apresenta 6787pb e o segundo 11154pb.

O potencial inibitório do ATA às endonucleases, neste experimento só foi aceito como ótimo quando a respectiva mediana chegou ao padrão de três cruzes.

A decisão do uso da concentração de 50 μ M de ATA, como melhor dose-resposta, levou em consideração a diferença no potencial inibitório em relação aos dois plasmídeos; quando em comparação com o controle negativo e o positivo do experimento, já que os resultados demonstraram que o extrato espermático pode ser utilizado como indutor da fragmentação de DNA plasmidial.

Apesar de apenas o pmGENIE3 ter diferença entre os grupos 7 e 8, com o controle positivo (9), o resultado esperado foi levado em consideração, já que a mediana do controle positivo foi de 2 ao invés de 1 (o que seria esperado para esse grupo).

Como controle positivo foi utilizado PBS sem cálcio e magnésio (GIBCO®), acrescido de 5µM de cálcio e 5µM de magnésio, já que a maioria das endonucleases são ativas na presença de íons de cálcio ou magnésio (MAIONE, 1997; SZCZYGIEL; MOISYADI; WARD, 2003; SOTOLONGO et al., 2005). Apesar disto, este não trouxe o resultado esperado para o mesmo (padrão de três cruzes) provando não ter sido o controle positivo ideal para experimento. Como o meio utilizado no ensaio de digestão plasmidial, desde a obtenção do extrato, foi PBS sem cálcio e magnésio (GIBCO®), talvez os resultados tenham tido um padrão de atividade de endonuclease reduzida.

Segundo MAIONE et al. (1997), as endonucleases espermáticas podem apresentar atividade moderada, mesmo na ausência de íons de cálcio; e, segundo YAMAUCHI et al. (2007) outras nucleases também estão presentes no espermatozoide murino, que não requerem íons cálcio e magnésio ou qualquer outra forma de ativação; o que demonstra que o experimento não foi prejudicado. Talvez uma alternativa para este controle positivo fosse o uso de cálcio ionóforo (A23187), que segundo MAIONE et al. (1997) induz a atividade de endonucleases celulares.

Apesar das nucleases espermáticas, originadas do ejaculado, serem muito mais efetivas do que as originadas do epidídimo (YAMAUCHI et al., 2007), o ensaio de digestão plasmidial realizado no presente estudo provou ser eficiente para os objetivos propostos, havendo uma concentração de ATA adequada à inibição das mesmas e assim, foi possível dar continuidade aos demais experimentos.

O experimento 2 possibilitou o conhecimento do padrão de inibição da fragmentação de DNA espermático com o ATA na TGME. A possível fragmentação de DNA cromossomal foi mensurada pelo teste SCDA e pelo ensaio de cometa alcalino.

O uso do SCDA juntamente com o uso do Cometa Alcalino se justifica pelo fato de haver complementaridade das duas técnicas. O SCDA por determinar uma susceptibilidade à fragmentação do DNA cromossomal frente a um desafio ácido leva a um rastreamento da população amostrada deixando evidente a porcentagem de células espermáticas que estão susceptíveis a uma fragmentação; ou seja, leva a uma avaliação da estabilidade da cromatina. O Cometa Alcalino determina a fragmentação presente na cromatina, no entanto por ser um ensaio laborioso, há chance de serem cometidos erros durante a execução. Portanto, a fim de minimizar os erros das técnicas e os riscos de resultados incongruentes optou-se pela realização simultânea das duas.

Conforme resultados descritos anteriormente, no ensaio de cometa alcalino, o grupo experimental 4 foi o que mais apresentou diferenças. Estas foram observadas nas variáveis: comprimento de cometa; porcentagem de DNA na cabeça de cometa; diâmetro da cabeça do cometa; comprimento da cauda do cometa; área da cauda do cometa; intensidade da cauda do cometa; porcentagem de DNA na cauda de cometa; momento da cauda de cometa e *olive moment*.

A variável comprimento de cometa representa o número de pixels na direção horizontal do cometa, indicando que espermatozoides de camundongos incubados com 500ng de DNA exógeno e ATA apresentam menor número de pixels em sentido horizontal do que espermatozoides incubados apenas com 500ng de DNA exógeno ou só espermatozoides. Isso pode indicar que o ATA no grupo de 500ng de plasmídeo foi efetivo na inibição da fragmentação de DNA espermático, apesar de ser uma medida que inclui tanto cabeça como cauda do cometa.

A diferença apresentada no tamanho da cabeça do cometa, além de demonstrar que existe uma variação no diâmetro desta, também indica que a incubação com 1000ng de DNA trouxe um incremento a este diâmetro. O ensaio de cometa alcalino não é uma técnica utilizada para mensurar tamanho de cabeça espermática com precisão, portanto para poder afirmar que a incubação com grandes quantidades de DNA pode trazer um aumento no diâmetro da cabeça, outras técnicas como microscopia eletrônica, microscopia de força atômica e até mesmo a hibridização *in situ* deveriam ser aplicadas.

O comprimento da cauda de cometa é a somatória do número de pixels relativos à cauda do cometa na direção horizontal, sendo uma variável diretamente relacionada à distância percorrida pelos fragmentos de DNA. Assim, diferenças entre grupos experimentais levam a inferir que o inibidor de endonucleases (ATA) parece impedir a fragmentação do DNA espermático, já que não houve diferença entre os grupos nos quais o mesmo foi utilizado. Os resultados das variáveis área da cauda de cometa e intensidade da cauda de cometa foram os mesmos.

O grupo 4 representa espermatozoides incubados com 500ng de PCX-EGFP e ATA enquanto que o grupo 5 representa espermatozoides incubados com 1000ng de DNA sem ATA. Deste modo, sugere-se que para que o ATA possa ter como efeito a diminuição da área do cometa na TGME a concentração de DNA exógeno é de grande importância. Assim sendo, apenas a concentração de 500ng de DNA com ATA ou a incubação com 1000ng sem ATA puderam diminuir essa área. No entanto, quando foi utilizada a concentração de 1000ng e o

ATA (grupo 6) o resultado apresentou a maior área de cauda de cometa espermático, não diferindo do grupo 1, o qual sofreu estresse da incubação prolongada.

Quando em longos períodos de incubação, a fragmentação de DNA espermático não pode ser inibida pelo ATA. Muratori et al.(2003) sugeriram que esta fragmentação de DNA em espermatozoides humanos, possa não ser devido às nucleases espermáticas atribuindo-a à espécies reativas de oxigênio. Extrapolando, para a espécie murina, as nucleases espermáticas talvez possam ser as responsáveis pela fragmentação de DNA quando em resposta à desafios que levam à ativação, como no caso o DNA plasmidial.

A similaridade estatística do grupo 4 com o grupo 5 para estas duas variáveis, pode ser devido à quantidade de DNA plasmidial utilizada. Segundo MAIONE et al. (1997) a quantidade de DNA cromossomal degradado aumenta drasticamente em células espermáticas desafiadas com 500ng de DNA plasmidial/ 10^6 células. Deste modo, esta quantidade seria o limiar para a ação das endonucleases espermáticas na degradação de DNA genômico em murinos.

No presente estudo utilizou-se também a quantidade de 1000ng de DNA exógeno no desafio às células espermáticas. O resultado para as variáveis intensidade de cauda de cometa e área da cauda de cometa demonstra que o uso do ATA com o desafio de 500ng de plasmídeo é efetivo na inibição das endonucleases, mas o uso de 1000ng de DNA não traz alterações no teste, o que sugere que o dobro de concentração de DNA exógeno não é um desafio maior às endonucleases, mas sim talvez uma forma de contenção das mesmas, sendo alvo primário de sua ação.

A porcentagem de DNA na cauda do cometa demonstrou que o grupo experimental 4 foi o mais eficiente na inibição de endonucleases espermáticas, o que corrobora com a hipótese de que o uso de 1000ng de DNA exógeno pode proteger o DNA genômico de espermatozoides murinos (Gráfico 5).

O momento de cauda de cometa (Quadro 4) por ser um parâmetro relativo e não absoluto demonstra ser uma variável mais restritiva à detecção de fragmentação de DNA, mensurando conjuntamente os parâmetros de porcentagem de DNA na cauda e no comprimento da cauda.

As diferenças apresentadas por essa variável demonstram que há realmente um limiar, no qual a ação das endonucleases é bloqueada pelo uso de ATA, que no caso, mostrou ser de 500ng.

O *Olive moment* é uma variável relativa determinada pela somatória dos valores de intensidade da cauda de cometa multiplicados por suas distâncias em relação ao centro da cabeça, dividido pela intensidade total do cometa (Quadro 4). Os resultados são idênticos aos resultados para o momento da cauda, sendo também um indicativo de que a ação das endonucleases espermáticas, no presente estudo, só foram bloqueadas pelo ATA quando os espermatozoides foram submetidos à TGME com 500ng de PCX-EGFP, já que os grupos com 1000ng e 1000ng com ATA, não diferiram entre si.

Ao compararmos as variáveis relativas à fragmentação de DNA obtidas com o ensaio de cometa alcalino, observamos que os grupos não submetidos à incubação com DNA ou os incubados sem o ATA, apresentaram maior grau de fragmentação. Isto sugere que, 5 horas de incubação, no presente estudo, foram suficientes para desencadear a atividade das endonucleases espermáticas, ou qualquer outro mecanismo possivelmente envolvido na degradação do genoma.

Apesar dos resultados do ensaio cometa alcalino sugerirem que há um limiar de concentração de plasmídeo ótimo para provável ativação das endonucleases e a inibição do ATA, o teste SCDA apontou resultados diferentes.

Os resultados do SCDA demonstraram que todos os grupos nos quais o ATA foi utilizado apresentaram maior susceptibilidade à denaturação ácida do DNA espermático (Tabela 2, Gráfico 12). O teste SCDA é baseado no princípio de denaturação ácida do DNA seguido por coloração LA. De acordo, com o deslocamento metacromático da fluorescência do LA, de verde para vermelho, se determina a condição do DNA (não denaturado ou denaturado, respectivamente) (CHOHAN et al., 2006). Deste modo, este teste mensura a susceptibilidade do DNA nuclear espermático à indução de denaturação (HENKEL et al., 2010) e não a fragmentação de DNA propriamente dita.

As diferenças no SCDA apresentadas entre os grupos experimentais demonstram que o uso do ATA aumentou a susceptibilidade da cromatina espermática às denaturações ácidas, podendo-se inferir que o ATA promove maior fragilidade do genoma.

Desta maneira é possível para as condições do presente estudo sugerir um mecanismo de ação das endonucleases espermáticas. O estresse, tanto da TGME, quanto da incubação por 5 horas, desencadeou a atividade de endonucleases espermáticas, as quais por terem habilidade de degradar moléculas de DNA o fizeram, mas de maneira inespecífica.

Em grupos nos quais houve a incubação com DNA plasmidial, as endonucleases possivelmente agiram primeiramente neste. Quando o ATA foi utilizado, ocorreu certa

inibição da atividade enzimática, a qual não foi total, o que pode ser devido a algum tipo de toxicidade que este inibidor provoca inicialmente aos espermatozoides.

Esta toxicidade pode ser verificada pela fragilidade encontrada no genoma espermático verificado pelo teste de SCDA, quando o ATA estava presente. No entanto, ao se comparar com os resultados do ensaio de cometa alcalino, verifica-se que apesar do ATA aumentar a susceptibilidade à fragmentação da cromatina espermática (teste SCDA), acaba tendo como ação final a inibição da mesma.

O experimento 3 possibilitou verificar se a internalização nuclear de DNA exógeno ao DNA cromossomal do espermatozoide murino aumenta com o uso do inibidor de endonucleases, o ATA, mensurado por quantificação absoluta em PCR de tempo real.

Os resultados da quantificação demonstraram que todos os grupos apresentaram algum grau de internalização nuclear do DNA exógeno. Os grupos 1 e 2 apesar de não terem sido incubados com DNA exógeno, apresentaram índice de incorporação, o que não ocorreu em todas as replicatas. Isto demonstra que, apesar de cuidados como o uso de ponteira com filtro, troca de ponteira entre cada pipetagem, extração de DNA das amostras com e sem DNA plasmidial em momentos separados, descontaminação dos tubos de 0,1µl com hipoclorito de sódio antes da reação de PCRq, entre outras, não foi possível evitar que as amostras fossem contaminadas com DNA plasmidial durante o experimento. Tal fato não prejudicou a análise dos resultados, pois a quantidade de DNA plasmidial resultante desses grupos foi infinitamente menor do que as obtidas nos grupos que foram incubados com PCX-EGFP (Tabela 3).

Os grupos 3 e 5 apesar de diferirem na concentração de PCX-EGFP não apresentaram diferença entre si, indicando que altas concentrações de DNA exógeno não são necessárias para a melhoria da técnica de TGME, já que a concentração de 500ng/10⁶ células acarretou em incorporação.

Os que apresentaram maior média de incorporação foram os grupos 3 e 5, os quais não foram pré-incubados com ATA. Uma possível explicação para este resultado é que a ativação das endonucleases na TGME apesar de levar à degradação de DNA genômico, também tem certa participação na integração de DNA exógeno, podendo ser a responsável pela criação de sítios de ligação ao DNA exógeno já que para que ocorra a integração é necessário que as endonucleases clivem o DNA endógeno espermático (ZORAQI; SPADAFORA, 1997).

Como o ATA tem potencial inibitório tanto em relação às endonucleases espermáticas quanto em relação à topoisomerase II (BEMCHOKROUN et al., 1995; MAIONE et al., 1997)

seu uso pode ter levado à diminuição do potencial de incorporação do PCX-EGFP ao genoma espermático.

Se o mecanismo pelo qual a integração de DNA exógeno ao espermatozoide de camundongo envolve as endonucleases espermáticas, para se ter um animal transgênico, com esta técnica, seria necessário muito mais do que apenas uma maior concentração de DNA exógeno na incubação, envolvendo toda uma maquinaria enzimática nuclear.

No presente estudo, apesar de terem menor média, os grupos nos quais o ATA foi utilizado apresentaram índices de incorporação de DNA exógeno, o qual não deve ter sido por contaminação, pois sua ordem de grandeza difere em duas casas decimais em relação aos grupos que esta ocorreu (Tabela 3).

Assim, a incorporação de PCX-EGFP nos grupos nos quais o ATA foi utilizado, sugere que o uso não impediu a internalização nuclear de PCX-EGFP, no entanto houve diminuição na quantidade de PCX-EGFP internalizada em relação aos grupos nos quais o ATA não foi utilizado. Uma hipótese é de que o ATA possa ter alguma toxicidade inicial aos espermatozoides de camundongos, o que impede o funcionamento da maquinaria espermática responsável pela integração levando à menor incorporação de DNA exógeno.

Destarte, apesar do ATA ser um inibidor geral de endonucleases, incluindo as espermáticas, o emprego nos protocolos de TGME, com intuito de aumentar a eficiência da técnica, não foi efetivo.

Portanto, apesar de impedir a fragmentação de DNA endógeno em espermatozoides murinos, o ATA não trouxe uma melhoria na técnica de TGME, o que refutou a hipótese formulada para este experimento. Mais estudos sobre os mecanismos envolvidos na incorporação de DNA exógeno ao genoma de espermatozoides de camundongos e a utilização de possíveis inibidores são necessários.

CONCLUSÕES

8.CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu avaliar a eficiência do ATA na TGME em murinos, como inibidor de endonucleases, nas condições experimentais propostas.

O ensaio de digestão plasmidial estabeleceu o potencial de inibição do ATA frente às endonucleases espermáticas determinando-se a concentração mais efetiva e também os diferentes padrões de digestão do extrato espermático em construções gênicas distintas.

O ATA mostrou-se um bom inibidor de endonucleases espermáticas, sendo possível determinar a concentração de DNA plasmidial na qual o ATA teve melhor eficiência, impedindo a fragmentação de DNA endógeno em espermatozoides murinos.

O uso do ATA na tentativa de melhoria da técnica da TGME, pela maior incorporação de DNA exógeno ao espermatozoide, não foi efetivo, podendo ter causado uma inibição parcial da incorporação de DNA exógeno.

Destarte, apesar de o ácido aurintricarboxílico ser efetivo na inibição de endonucleases endógenas tanto em ensaios de digestão plasmidial quanto na fragmentação de DNA genômico de espermatozoides murinos seu uso conjuntamente com altas concentrações de DNA exógeno não foi eficiente na melhoria da TGME.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 354-360, 2002.
- BOE-HANSEN, G. B.; ERSBØLL, A. K.; CHRISTENSEN, P. Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human semen. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, p. 360-368, 2005.
- BEMCHOKROUN, Y.; COUPRIE, J. Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in chinese hamster fibrosarcoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.3, p.305-313, 1995.
- BRACKETT, B. G.; BARANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 2, p. 353-357, 1971.
- CAMAIONI, A; RUSSO, M. A; ODORISIO, T.; GANDOLFI, F.; FAZIO, V.M.; SIRACUSA, G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 1, p. 203-212, 1992.
- CAMPOS, V. F.; LEON, P. M. M. DE; KOMNINOU, 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**, v. 76, n. 8, p. 1552-1560, 2011.
- CHOHAN, K. R.; GRIFFIN, J. T.; LAFROMBOISE, M.; JONGE, C. J. DE; CARRELL, D. T. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 1, p. 53-59, 2006.
- COMET SCORE, versão 1.5. Disponível em:
<http://autocomet.com/products_cometscore.php>. Acesso em: 20 jan. 2012.
- COUNIS, M. F.; TORRIGLIA, A. DNases and apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 78, p. 405-414, 2000.
- COWARD, K.; KUBOTA, H.; HIBBITT, O.; MCILHINNEY, J.; KOHRI, K.; PARRINGTON, J. Expression of a fluorescent recombinant form of sperm protein phospholipase C zeta in mouse epididymal sperm by in vivo gene transfer into the testis. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1281-1289, 2006. Supplement, 1.
- DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 15, n. 7, p. 1552-1561, 2000.
- EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 240, p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MILAZZOTTO, M. P.; ROCHA, A.M.; MARTINS, L.F.; SIMÕES, R.; PAULA-LOPES, F.F.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Exogenous DNA uptake by bovine spermatozoa does not induce DNA fragmentation. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 563-568, 2010.

FRASER, L.; DRURY, L. The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. **Biology of Reproduction**, v. 13, p. 513-518, 1975.

FURIMSKY, A.; VUONG, N.; XU, H.; KUMARATHASAN, P.; XU, M.; WEERACHATYANUKUL, W.; KHALIL; KATES, M.; TANPHAICHITR, N. Percoll Gradient-Centrifuged Capacitated Mouse Sperm Have Increased Fertilizing Ability and Higher Contents of Sulfogalactosylglycerolipid and Docosahexaenoic Acid-Containing Phosphatidylcholine **Compared to Washed Capacitated Mouse Sperm** **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 574-583, 2005.

GLASSPOOL-MALONE, J.; MALONE, R. W. Marked enhancement of direct respiratory tissue transfection by aurointricarboxylic acid. **Human Gene Therapy**, v. 10, n. 10, p. 1703-1713, 1999.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (ILAR). Earth and Life Studies (DELS). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. National Academy Press, Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140>. Acesso em: 04 mar. 2012.

HALLICK, R. B.; CHEIM, B. K.; GRAY, P. W.; OROZCO, E. M. Use of aurointricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. **Nucleic Acids Research**, v. 4, n. 9, p. 3055-3064, 1977.

HAREL-MARKOWITZ, E.; GUREVICH, M.; SHORE, L. S.; KATZ, A.; STRAM, Y.; SHEMESH, M. Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 1046-1052, 2009.

HENKEL, R.; HOOGENDIJK, C. F.; BOUIC, P. J. D.; KRUGER, T. F. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. **Andrologia**, v. 42, n. 5, p. 305-313, 2010.

HOGAN, B.; CONSTINI, F.; LACY, E. **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**, In vitro fertilization. Universidade de Michigan: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. p. 107.

KANG, J. H.; HAKIMOV, H.; RUIZ, A; et al. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1288-1296, 2008.

- LAVITRANO, M.; BUSNELLI, M.; CERRITO, M. Sperm-mediated gene transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 19-23, 2006.
- LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M.; DOLCI, S.; FARACE, M.G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. **Cell**, v. 57, n. 5, p. 717-723, 1989.
- LAVITRANO, M.; MAIONE, B.; FORTE, E.; FRANCOLINI, M.; SPERANDIO, S.; TESTI, R.; SPADAFORA, C. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. **Experimental Cell Research**, v. 233, n. 1, p. 56-62, 1997.
- LAVITRANO, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; LAZZERESCHI, D.; DI STEFANO, C.; FIORETTI, D.; GIANCOTTI, P.; MARFÉ, G.; PUCCI, L. RENZI, L.; WANG, H.; STOPPACCIARO, A.; STASSI, G.; MASSIMO SARGIACOMO, M.; SINIBALDI, P.; TURCHI, V.; GIOVANNONI, R.; CASA, G.D.; SEREN, E.; ROSSI, G. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14230-14235, 2002.
- LEE, D.; KIM, M.-J. Antiapoptotic Effect of Aurintricarboxylic Acid; Extracellular Action versus Inhibition of Cytosolic Protein Tyrosine Phosphatases. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 342-346, 2008.
- LASSALE, B.; ZIYYAT A.; TESTART, J.; FINAZ, C.; LEFE`VRE, A. Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2 p. 388-394, 1999.
- LI, L.; SHEN, W.; MIN, L.; DONG, H.; SUN, Y.; PAN, Q. Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 18, n. 6, p. 689-695, 2006.
- MAGNANO, A R.; GIORDANO, R.; MOSCUFO, N.; BACCETTI, B.; SPADAFORA, C. Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, n. 1-2, p. 187-196, 1998.
- MAIONE, B.; LAVITRANO, M.; SPADAFORA, C.; KIESSLING, A A. Sperm-mediated gene transfer in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, n. 4, p. 406-409, 1998.
- MAIONE, B.; PITTOGGI, C.; ACHENE, L.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. **DNA and Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 1087-1097, 1997.
- MURATORI, M.; MAGGI, M.; SPINELLI, S. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 2, p.253-262, 2003.
- PITTOGGI, C.; RENZI, L; ZACCAGNINI, G.; CIMINI, D.; DEGRASSI, F.; GIORDANO, R.;LAVIA, P.; SPADAFORA, C. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in

nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 3537-3548, 1999.

SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Artificial insemination in cattle with DNA - treated sperm. **Animal Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 41-50, 1995.

SCIAMANNA, I.; PICCOLI, S.; BARBERI, L.; ZACCZGNINI, A.R.M.; GIORDANO, R.; CAMPEDELLI, P.; HODSON, C.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 301-305, 2000. Supplement.

SHAMAN, J. A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, W. S. Sperm DNA fragmentation: awakening the sleeping genome. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, pt. 3, p. 626-628, 2007.

SINGH, N. P. (Courtesy). Comet assay: definitions. [2012]. Disponível em: <<http://www.cometassayindia.org/definitions.htm>> Acesso em: 06 mar. 2012.

SMITH, K.; SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. **BioEssays**, v. 27, n. 5, p. 551-562, 2005.

SOTOLONGO, B.; HUANG, T. T. F.; ISENBERGER, E.; WARD, W. S. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **Journal of andrology**, v. 26, n. 2, p. 272-80, 2005.

SPADAFORA, C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. **BioEssays**, v. 20, n. 11, p. 955-964, 1998.

SPADAFORA, C.; SCIAMANNA, I.; PITTOGGI, C. Transferência gênica mediada por espermatozoides. In: COLLARES, T. (organizador) Animais Transgênicos: princípios e métodos. São Carlos: Suprema, 2005. 348 p.

SPADAFORA, C. Sperm-mediated “reverse” gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 23, n. 4, p. 735-740, 2008.

SZCZYGIEL, M. A.; MOISYADI, S.; WARD, W. S. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1903-1910, 2003.

WARD, M. A.; WARD, W. S. A model for the function of sperm DNA degradation. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 16, n. 5, p. 547-554, 2004.

WARD, W. S. Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 841-843, 2011.

WHITTINGHAM, D. G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 14, p. 7-12, 1971. Supplement, 1.

YAMASHIRO, H.; TOYOMIZU, M.; KIKUSATO, M.; TOYAMA, N.; SUGIMURA, S.; HOSHINO, Y.; ABE, H.; MOISYADI, S.; SATO, E. Lactate and adenosine triphosphate in the extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm. **Journal American Association Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 2, p. 160-166, 2010.

YAMAUCHI, Y.; DOE, B.; AJDUK, A.; WARD, M. A. Genomic DNA damage in mouse transgenesis. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 5, p. 803-812, 2007.

ZACCAGNINI, G.; MAIONE, B.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Increased production of mouse embryos in in vitro fertilization by preincubating sperm cells with the nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1549-1553, 1998.

ZANI, M.; LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; LULLI, V.; MAIONE, B.; SPERANDIO, S.; SPADAFORA, C. The mecanismo f binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. **Experimental Cell Research**, v. 217, p. 57-64, 1995.

ZORAQI, G.; SPADAFORA, C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. **DNA and Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 291-300, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Validação do ensaio de susceptibilidade à denaturação ácida espermática (SCDA)

Para a validação do SCDA e a caracterização das populações a serem analisadas, o controle da população de células negativas (não susceptíveis à ação do detergente ácido – fluorescência verde) e o de células positivas (susceptíveis à ação do detergente ácido – fluorescência vermelha), foram determinados. Para isto, uma amostra de sêmen de um animal aleatório foi submetida à incubação por duas horas com peróxido de hidrogênio 30% na proporção 1:2 de volume de amostra e de peróxido de hidrogênio, respectivamente, sendo este considerado o controle positivo. Para o controle negativo, a mesma amostra permaneceu à 4°C, em geladeira, durante o mesmo período de incubação do controle positivo com peróxido de hidrogênio.

Realizou-se o SCDA no controle negativo obtendo-se um histograma com pico único, analisou-se a amostra positiva, obtendo-se também um pico único, porém deslocado à direita no histograma de AlfaTYlog. A amostra formada foi analisada com a mistura em mesma proporção (50%) dos dois controles, e com proporções de mesma grandeza (75% controle negativo e 25% do controle positivo; e, 25% controle negativo e 75% do controle positivo) obtendo-se picos diferentes (Figura 13).

A equação de reta estabelecida com os resultados desta padronização apresentou R^2 de 0,9797 (Gráfico 13), podendo-se utilizá-la para estabelecer o ponto de corte para as células positivas ou negativas para o SCDA, o qual foi determinado em relação aos pontos médios entre os picos obtidos da mistura de células negativas e positivas.

O AlfaTYlog é o resultado da divisão da fluorescência amarela pela fluorescência total (amarela + verde) e serve para quantificar a extensão da denaturação da estrutura da cromatina de cada espermatozoide.

Figura 13 – Histogramas das populações de Alfa T Y log – São Paulo, 2012.

Legenda: A: População positiva, o qual 100% das células foram submetidas ao peróxido de hidrogênio. B: População negativa. C: 50% da população não submetida ao peróxido de hidrogênio misturada com 50% da submetida. D: 75 % da população não submetida ao peróxido de hidrogênio e 25% da não submetida. E: 25% da população não submetida ao peróxido de hidrogênio e 75% submetida

Gráfico 13 – Representação gráfica da equação de reta estabelecida com a padronização do SCDA- São Paulo, 2012.

APÊNDICE B – Curva padrão da quantificação absoluta de DNA exógeno incorporado aos espermatozoides

Para a quantificação absoluta de DNA exógeno incorporado aos espermatozoides em cada grupo experimental foram realizadas curvas padrões, nas quais amostras de concentrações conhecidas do plasmídeo PCX-EGFP foram utilizadas para confecção de uma curva contendo oito pontos (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002; 0,00002; 0,000002 e 0,0000002 ng).

As curvas padrões foram utilizadas como comparação na quantificação da incorporação de PCX-EGFP nos espermatozoides na qPCR, e tiveram equação de reta com $R^2=0,996$ e $0,992$, respectivamente, no qual o R^2 deve ser o mais próximo de 1, que juntamente com *Slope*, *Y-intercept* e Eficiência determinam a eficácia da reação de PCRq (Figuras 14 e 15).

Os resultados de *Slope*, *Y-intercept* e Eficiência para cada curva foram: *Slope* -3. 475 e -3.225; *Y-intercept*: 9.87 e 10.78 e, Eficiência: 0.94 e 1.04, respectivamente, para cada curva padrão.

As curvas de dissociação foram realizadas como controle de qualidade da especificidade da reação.

Figura 14- Imagem representativa da curva padrão da primeira reação de qPCR realizada no experimento 3. Curva de quantificação (A) e de dissociação (B) – São Paulo, 2012.

A

B

Figura 15 – Imagem representativa da curva padrão da segunda reação de qPCR realizada no experimento 3. Curva de quantificação (A) e de dissociação (B) – São Paulo, 2012.

A

B

ANEXO A- Soluções utilizadas na obtenção de DNA plasmidial

Meio de cultivo bacteriano líquido

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Lennox LB Broth Base	Invitrogen	12780-052	20g
Água destilada (q.s.p.)			1L

Autoclavada por 20 minutos. 121°C

Meio de cultivo bacteriano sólido

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Lennox L Agar	Invitrogen	22700-025	32g
Água destilada (q.s.p.)			1L

Autoclavada por 20 minutos. 121°C

ANEXO B- Soluções e meios usados no ensaio de digestão plasmidial**Solução de PBS sem Cálcio e Magnésio**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline	Gibco	21600-010	1 sachê
Água Milli Q (q.s.p.)			1L

Solução de PBS com adição de Cálcio e Magnésio

Reagente	Fabricante	Catálogo	
CaCl ₂	Sigma	C5670	5 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M 2393	5mM
Solução PBS sem Cálcio e Magnésio (q.s.p.)	Gibco	21600-010	100ml

Solução Estoque de ATA

Reagente	Fabricante	Catálogo	
ATA	Invitrogen	A0885	2500µM
Água Milli Q (q.s.p.)			1ml

ATA 50

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Solução estoque de ATA	Invitrogen	A0885	20%(m/v)
Água Milli Q (q.s.p.)			1ml

ATA25

Reagente	Fabricante	Catálogo	
ATA 50	Invitrogen	A0885	50% (m/v)
Água Milli Q (q.s.p.)			1ml

ATA10

Reagente	Fabricante	Catálogo	
ATA 25	Sigma	A0885	20% (m/v)
Água Milli Q (q.s.p.)			1ml

TX-PBS

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Triton X	Sigma	X-100	1% (m/v)
Solução de PBS sem Cálcio e Magnésio (q.s.p)	Gibco	21600-010	1ml

Hoechst 33342

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Hoechst 33342	Sigma	B2261	0,005mg
Água Milli Q (q.s.p.)			1ml

Fertilization medium (FM)

Reagente	Fabricante	Catálogo	
NaCl	Sigma	S5886	10mM
NaHCO ₃	Sigma	S5761	20mM
Glucose	Sigma	G6152	5mM
KCl	Sigma	P5405	2mM
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S5136	0,2mM
Sodium Pyruvate	Sigma	P3662	0,5mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902	2mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	M2393	0,5mM
Sodium lactate*	Sigma	L7900	0,35% (v/v)

* 60% syrup

Adicionado BSA (0,4mg/ml) no momento do uso

Solução TAE 10X

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Tris base	Sigma	93362	0,4M
Ácido acético glacial	Synth	A1019.01.BJ	0,2M
EDTA	Sigma	E5134	0,5M
Água MilliQ (q.s.p)			1l

Ajustar o pH para 8,5

Gel de agarose

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Agarose	Sigma	A-9539	0,7%(m/v)
TAE 1x			0,1% TAE 10X

Solução de Brometo de etídio

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Brometo de etídeo	Bioagency	161-04333N	
TAE 1x			0,1% TAE 10X

ANEXO C - Soluções para teste SCDA**Tampão TNE**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl	Fluka	93363	0,01M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
EDTA	Sigma	E-5134	1mM
Água destilada (q.s.p)			500ml

Ajustar o pH para 7.4

Solução detergente ácido

Reagente	Fabricante	Catálogo	
HCl	Merck	K24537117	0,08M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
Triton x-100	Sigma	X-100	0,1% (v/v)
Água destilada			500ml

Ajustar o pH para 1.2

Solução de Laranja de Acridina (L.A) – estoque

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Laranja de Acridina	Sigma	A-6014	1mg/ml
Água destilada (q.s.p)			10ml

Solução de Laranja de Acridina - Uso

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Ácido cítrico	Sigma	0,12	0,1M
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S-5136	0,2M
EDTA	Sigma	E-5134	0,001M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15M
L.A estoque			6µg/ml
Água destilada (q.s.p)			120ml

Ajustar o pH para 6.0

ANEXO D - Soluções para ensaio COMETA**Solução de TBE 1X**

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Trizma Base	Fluka	93362	0,089M
Ácido Bórico	Carlo Erba	402766	0,089M
EDTA	Sigma	E-5134	0,002M
Água destilada q.s.p			1L

Agarose *Normal Melting* (NM)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Agarose <i>Normal Melting</i>	Sigma	A-9539	1%(m/v)
TBE 1X (q.s.p)			100ml

Manter a 4°C

Agarose *Low Melting* (LM)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	100ml
Agarose <i>Low Melting</i>	Sigma	A-4018	0,75% (m/v)
TBE 1X			100ml

EDTA- Na_2

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
EDTA	Sigma	E-5134	1M
Água MilliQ (q.s.p)			1L

Ajustar o pH para 7.8

Tris-HCl

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl	Fluka	93363	1M
Água MilliQ (q.s.p)			100ml

Ajustar o pH para 7.8

NaCl

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
NaCl	Sigma	S-5886	5M
Água MilliQ			1L

DTT

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen	15508-013	1M
Água MilliQ (q.s.p)			4ml

Aliquotar e manter a -20°C

Solução de ressuspensão da proteinase K

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl; pH 7.5	Fluka	93363	10mM
CaCl ₂	Sigma	C-5670	20mM
Glicerol	Sigma	G-5516	50% (v/v)
Água MilliQ q.s.p			10ml

pH 7.5

Solução de Proteinase K

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Proteinase K	Invitrogen	25530-015	2mg/ml
Solução de ressuspensão (q.s.p)			2ml

Aliquotar e manter a -20°C

Solução de Cloreto de cálcio hidratado

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
CaCl ₂	Sigma	C-5670	0,2M
Água MilliQ			10ml

Poli-L-Lisina 0,01%

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
Poly-L-Lysine	Sigma	P-8920	0,01%
Água destilada (q.s.p)			200ml

Manter a -4°C

Solução de Lise I

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
EDTA-Na ₂			100mM
Tris HCl	Fluka	93363	10mM
NaCl	Sigma	S-5886	2,5M
Proteinase K (20µg/mL)	Invitrogen	25530-015	20µg/mL
Água MilliQ (q.s.p)			1L

Manter a -4°C

Solução de lise II

Reagentes	Fabricante		
SDS	Sigma	L4390	4% (m/v)
Água MilliQ (q.s.p)			1L

Solução de Lise III

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
EDTA-Na ₂			100mM
Tris HCl	Fluka	93363	10mM
NaCl	Sigma	S-5886	2,5M
Triton X-100	Sigma	X-100	4% (v/v)
DTT; pH 11.0	Invitrogen	15508-013	40mM
Água MilliQ (q.s.p)			1L

Manter a -4°C

Solução alcalina de eletroforese

Reagentes	Fabricante	Catálogo	1L
NaOH	Synth	H1017.01.AH	300mM
.EDTA-Na ₂			1mM
Água MilliQ (q.s.p)			1L

pH>13.0

SYBR Green I

Reagentes	Fabricante	Catálogo	
SYBR Green I	Sigma	S9430	10000x
Água destilada (q.s.p)			1ml

* solução para coloração de cada lâmina

ANEXO E- Soluções para extração de DNA genômico**SDS 10%**

Reagente	Fabricante	Catálogo	
SDS	Sigma	L4390	10%(m/v)
Água Milli Q (q.s.p.)			100ml

Solução de lise

Reagente	Fabricante	Catálogo	
acetato de Sódio	Sigma	S2889	0,2M
SDS	Sigma	L4390	10%(m/v)
Proteinase K	Invitrogen	25530-015	20mg/ml

Solução de TE 10x

Reagente	Fabricante	Catálogo	
Tris-HCl	Fluka	93363	10mM
EDTA			1mM