WEBER BERINGUI FEITOSA

**ESPERMATOZÓIDE BOVINO COMO VETOR DE
TRANSGENE: INTERAÇÃO DO DNA EXÓGENO E
VIABILIDADE ESPERMÁTICA**

SÃO PAULO
2006

WEBER BERINGUI FEITOSA

**Espermatozóide bovino como vetor de transgene: interação do
DNA exógeno e viabilidade espermática**

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 Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Mayra Elena Ortiz D'Avila
Assumpção

São Paulo

2006

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.1676
FMVZ

Feitosa, Weber Beringui
Espermatozóide bovino como vetor de transgene: interação do
DNA exógeno e viabilidade espermática / Weber Beringui Feitosa. -
- São Paulo: W. B. Feitosa, 2006.
138 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de
Reprodução Animal, 2006.

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

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

1. Espermatozóide. 2. Transferência gênica. 3. DNA exógeno.
4. Transgenia animal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Espermatozóide bovino como vetor de transgene: Efeito da estrutura e do tamanho do DNA exógeno na internalização no núcleo do espermatozóide", Protocolo nº399/2003, utilizando sêmen bovino, sob a responsabilidade da Profª Drª Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão do dia 10 de março de 2004.

(We certify that the Research "Bovine spermatozoa as vector for transgene: Effect of the structure and length of the DNA upon internalization on sperm nucleus" protocol number 399/2003, utilizing bovine's semen, under the responsibility of Prof. Dr. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 03/10/2004 meeting.

São Paulo, 10 de março de 2004

Profª Drª
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FEITOSA, Weber Beringui

Título: **Espermatozóide bovino como vetor de transgene:** interação do DNA exógeno e viabilidade espermática

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico esta dissertação aos
Meus Pais que poderiam ter sido
os autores do “best seller” *Quem
Ama Educa* e quem sabe serem
os autores de um próximo
volume *Quem Educa Ama*.

AGRADECIMENTOS

À **Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Zaidan Dagli** do Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por gentilmente ter permitido a utilização do Real-Time.

À **Prof^a. Dr^a. Angela Maria Vianna-Morgante** do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Pela orientação e direcionamento na metodologia deste projeto

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha** do Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por ter gentilmente permitido a utilização do citômetro de fluxo.

Ao Dr. **André Monteiro da Rocha** pelo auxílio na padronização e utilização do citômetro de fluxo, interpretação e estatística dos dados.

Ao Dr. **José Luís Avanzo** pelo auxílio na padronização e utilização do Real-Time

À Dr. **Elizabeth Angélica Leme Martins** do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Mais que permitir a utilização do seu laboratório, você permitiu a utilização dos seus equipamentos, materiais de consumo, tempo e do seu cérebro que foram fundamentais na conclusão deste trabalho. Muito Obrigado!

À **Ana Paula, Érica Tati...** do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pela receptividade, ajuda e por tornarem a minha breve estadia no Instituto Butantan mais agradável.

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda** e à **Dr^a. Eneiva Carla Carvalho Celeghini** do Centro de Biotecnologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo auxílio com as sondas fluorescentes.

Ao **Prof. Dr. Hernando Antonio del Portillo Obando** do Departamento de Parasitologia e ao **Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado** do Departamento de Microbiologia, ambos do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, por terem cedido, respectivamente, amostras do *Plasmodium falciparum* e *Streptomyces avermitilis*.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fecundação *In Vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, **Alessandra Brandão, Alessandra Nicácio, Ana Rita, Aníbal, Camilla, Cláudia, José Sérgio, Leydson, Marcelo, Flávia, Heloísa, Maria Angélica, Mariana Marques, Mariana Rovegno, Mariel, Marcella, Renata e Viviane** e a eterna pós-graduanda **Prof^a. Dr^a. Camila Vannuchi**, pela ajuda no projeto, convivência, pelas alegrias, tristezas, festas e brigas, como em toda verdadeira família.

Em especial à **Camilla** e à **Marcella**, co-autoras desta dissertação, por terem ajudado neste projeto como se fosse o de vocês.

À **Marcella**, a gorda mais gorda que eu já conheci.

Ao **Prof. Dr. José Antonio Visintin** pelo incentivo, amizade e por acreditar e confiar em mim. Com você eu aprendi que na Universidade não existe só pesquisa, mas também ensino. Fico muito feliz e me orgulho muito de ter vivenciado o seu amor pelo ensino e pela graduação.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção**.

“Mayra, os espermatozóides não coraram.

Mayra, os espermatozóides estão todos mortos.

Mayra, o PCR não amplificou.

Mayra, o PCR amplificou o negativo.

Mayra, a enzima de restrição não digeriu.

Mayra, o vetor não clonou.

Mayra, as bactérias não cresceram.

Mayra, a extração de DNA não funcionou “.

Ainda não sei se a orientadora encarou tudo isso numa boa, mas a amiga resolveu tudo com maestria. Obrigado pela orientação, amizade, companheirismo, apoio e incentivo. Por fazer o papel de orientadora, mãe, amiga, psicóloga e às vezes de psiquiatra. Por me receber sempre com ternura e um sorriso nos meus momentos mais difíceis e por acreditar naquele rapaz que há três anos te perturbava insistentemente por orientação. Espero ter correspondido às expectativas!!!

À minha querida **Vó**, pelo carinho, apoio, orientações, conselhos e pelos bolos e comidas sempre a minha espera quando eu volto para casa.

Ao meu irmão **Júnior** pela amizade e estar sempre ao meu lado. Não importa a sua idade, você vai ser sempre o meu maninho. Me orgulho muito de você.

À tia **Lucimar** e às primas **Jussara** e **Jaciara**, pelo apoio, torcida, conversas e por estarem sempre comigo.

Ao **Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes**, meu primeiro orientador, pela oportunidade e por me mostrar o que é Ciência. Se hoje eu completo mais uma fase foi porque você, no começo de tudo, acreditou em mim.

Aos ex-pós-graduandos, **Dr. Luis Mattos** com quem eu comecei a estagiar na área de reprodução animal e que me incentivou a fazer iniciação científica, **Dr^a. Vanessa Ueno** e ao Dr. **Paulo Adona** que me ensinaram a sobreviver num laboratório, a fazer MIV, FIV e CIV, etc. etc. etc, e meio que me co-orientaram.

Ao **Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva**, pela ajuda em conseguir um estágio que se tornou mestrado.

E seguindo a linha recordar é viver, aos amigos **Daniel, João Paulo, José e Roberto**, pela amizade e também pelo apoio, incentivo e torcida durante o processo seletivo para o mestrado.

Ao **Alexandre, Aníbal, Fábio, Marco, Marcelo, Nélcio e Rodrigo** pessoas, colegas e amigos com que morei nestes últimos anos, pela compreensão, conversas, amizade e tolerância.

Dona Silvia e Neide, pelo Santo cafezinho de todos os dias, protetor desta dissertação.

A **Harumi, Thais e Alice** pela ajuda com a parte administrativa e entraves burocráticos.

Ao **Departamento de Reprodução Animal**, pela ótima estadia.

Ao **Conselho de Área** do programa de pós-graduação em Reprodução Animal, pela oportunidade.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa (Projeto: 03/10234-7).

E por último, não por ordem de importância, mas como os artistas principais que encerram um festival, aos **meus pais** pelo carinho, ensinamentos, amizade, compreensão, incentivo e por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos em prol dos meus. Vocês me incentivaram e hoje eu estou aqui. Amo vocês mais que tudo.

Qualquer que seja o seu sonho

Keep walking.

(Johnnie Walker (Red, Black, Green, Gold e Blue label))

“I’m walking...”

I am a slow walker but I never walk backwards.

(Abraham Lincoln)

RESUMO

FEITOSA, W. B. **Espermatozóide bovino como vetor de transgene:** interação do DNA exógeno e viabilidade espermática. [Bovine spermatozoa as transgene vector: exogenous DNA interaction and sperm viability] 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A transferência gênica mediada por espermatozóide (TGME) por ser um método teoricamente simples e barato tem sido usada na produção de animais transgênicos. Entretanto, os resultados são variáveis e inconstantes. Para otimizar a TGME é necessário estabelecer o tempo, a quantidade e o tipo de DNA exógeno que será incubado com os espermatozóides. O estudo dos efeitos destes parâmetros na TGME foi o objetivo deste trabalho. Para avaliar o efeito da adição do DNA exógeno durante 0, 1, 2, 3 e 4 horas de incubação na viabilidade espermática foram utilizadas as sondas fluorescentes Hoechst 33342, Iodeto de propídeo, JC-1 e FITC-PSA. Na avaliação do efeito do tempo de incubação (60, 90 e 120 minutos) nos índices de apoptose e necrose, os espermatozóides foram corados com as sondas fluorescentes Yo-pro e Iodetoto de propídeo e avaliados pelo citômetro de fluxo, e os índices de transfecção avaliados pela PCR em tempo real. Para avaliar o efeito da quantidade e da seqüência de DNA exógeno foram construídas seqüências de tamanhos e estruturas diferentes. Para as seqüências de tamanhos diferentes, foram utilizadas seqüências de 2,2; 5,5 e 8,5kb nas concentrações de 500ng ou 130ng da seqüência de 2,2kb, 323ng da seqüência 5,5kb e 500ng da seqüência de 8,5kb. Para as seqüências de diferentes estruturas foram utilizadas seqüências ricas em oligonucleotídeos AT, GC ou intermediária (IN). Foram avaliados o efeito das

seqüências de diferentes tamanhos, estruturas e concentrações na indução de apoptose dos espermatozóides pelo citômetro de fluxo e os índices de transfecção por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que não houve efeito da adição do DNA exógeno sobre a viabilidade espermática. Entretanto, houve efeito do tempo de incubação onde foi observado maior viabilidade espermática com 1 hora de incubação (35,7%). O tempo de incubação não teve efeito na indução de apoptose, mas foi observado efeito no índice de transfecção apresentando maior quantidade de DNA exógeno associado aos espermatozóides às 2 horas de incubação. A quantidade, o tamanho e a estrutura de DNA exógeno não influenciaram o índice de apoptose, assim como a quantidade de DNA não teve efeito nos índices de transfecção. Entretanto, foi observado efeito do tamanho e da estrutura do DNA, no qual a seqüência de 5,5kb apresentou melhores resultados de transfecção tanto na quantidade de 500ng e 323ng. A seqüência rica em AT também apresentou melhor resultado de transfecção em relação à seqüência rica em GC e a intermediária. Em conclusão, o tempo de incubação reduziu a viabilidade espermática, porém, aumentou os índices de transfecção. A transfecção dos espermatozóides não foi influenciada pela quantidade da seqüência, mas foi influenciada pelo tamanho e estrutura da seqüência. A apoptose e necrose das células espermáticas não foram influenciadas pela quantidade, tamanho e estrutura do DNA exógeno.

Palavras-chave: Espermatozóide. Transferência gênica. DNA exógeno. Transgenia animal

ABSTRACT

FEITOSA, W. B. **Bovine spermatozoa as transgene vector:** exogenous DNA interaction and sperm viability. [Espermatozóide bovino como vetor de transgene: interação do DNA exógeno e viabilidade espermática] 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Sperm-mediated gene transfer (SMGT) has been used for transgenic animal production because it is a theoretically simple and low cost method. However, results are various and without repetibility. In order to optimize SMGT it is necessary to determine the time, amount and sequence of exogenous DNA for incubation with spermatozoa. The objective of this study was to verify the effect of these three parameters on SMGT. To assess the effect of exogenous DNA addition on sperm viability after 0, 1, 2, 3 and 4 hours of incubation, fluorescent probes Hoechst 33342, propidium iodide, JC-1 and FITC-PSA were used. To evaluate effects of incubation time (60, 90 and 120 minutes) on apoptosis and necrosis rates, spermatozoa were stained with fluorescent probes Yo-pro and propidium iodide and analyzed by flow cytometry; transfection rates were evaluated by real-time PCR. To assess the effect of exogenous DNA amount and sequence, different sized and structured sequences were made. Different sized sequences of 2.2, 5.5 and 8.5kb were used, with concentration of 500ng or 130ng of 2.2 sequence, 500 or 323ng of 5.5 sequence and 500ng of 8.5 sequence. Different structured sequences were rich in AT, GC or intermediate (IN). The effect of different size, structure and concentration on spermatozoa apoptosis induction were analyzed by flow cytometer and transfection rates by real-time PCR. Results show that no effects occurred on spermatozoa

viability after exogenous DNA addition. However, time effect occurred: higher spermatozoa viability was observed after 1 hour of incubation (35.7%). Incubation time had no effect on apoptosis induction; otherwise, transfection rates presented higher amounts of exogenous DNA associated to spermatozoa after 2 hours of incubation. Amount, size and structure of DNA did not influence apoptosis and necrosis rates and DNA amount had no effect on transfection rates. However, size and structure effect were observed: 5.5kb sequence presented better transfection results using 500ng or 323ng. AT- rich sequence also presented better transfection rates than GC-rich and IN sequences. In conclusion, incubation time reduced spermatozoa viability, although enhanced the transfection levels. Spermatozoa transfection was not influenced by DNA sequence amount, but was influenced by the size and structure of the sequence. Apoptosis and necrosis of sperm cells were not influenced by amount, size and structure of exogenous DNA.

Key-words: Spermatozoa, Gene transfer, Exogenous DNA, Animal transgenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	INTERAÇÃO.....	23
2.2	INTERNALIZAÇÃO.....	27
2.3	FATORES QUE AFETAM A INTERAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO.....	29
2.4	METODOLOGIAS PARA A TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES.....	31
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32

CAPÍTULO 1 - Avaliação da influência do DNA exógeno e do tempo de incubação sobre as características morfológicas das células espermáticas

	RESUMO.....	37
3	INTRODUÇÃO.....	38
4	HIPÓTESE.....	40
5	OBJETIVOS.....	40
5.1	GERAL.....	40
5.2	ESPECÍFICOS.....	40
6	MATERIAL E MÉTODO.....	41
6.1	OBTENÇÃO DO DNA EXÓGENO.....	41
6.1.1	Transformação das bactérias.....	42
6.1.2	Extração do DNA plasmidial.....	42
6.2	INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COM O DNA EXÓGENO.....	44
6.3	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MITOCÔNDRIA.....	45

6.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
7	RESULTADOS.....	48
8	DISCUSSÃO.....	57
9	CONCLUSÕES.....	64

CAPÍTULO 2 – Efeito do tempo de incubação de células espermáticas com o DNA exógeno sobre o índice de transfecção e apoptose

	RESUMO.....	66
10	INTRODUÇÃO.....	67
11	HIPÓTESE.....	68
12	OBJETIVOS.....	68
12.1	GERAL.....	68
12.2	ESPECÍFICOS.....	68
13	MATERIAL E MÉTODO.....	69
13.1	OBTENÇÃO DO DNA EXÓGENO.....	69
13.2	INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COM O DNA EXÓGENO...	69
13.3	AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E OU NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	70
13.4	EXTRAÇÃO DO DNA DOS ESPERMATOZÓIDES.....	72
13.5	DETECÇÃO DOS ÍNDICES DE TRANSFECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....	74
13.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
14	RESULTADOS.....	76
15	DISCUSSÃO.....	82
16	CONCLUSÕES.....	87

CAPÍTULO 3 – Efeito do tamanho, da estrutura e da concentração da sequência de DNA exógeno sobre os índices de transfecção e de apoptose das células espermáticas

	RESUMO.....	89
17	INTRODUÇÃO.....	90
18	HIPÓTESE.....	92
19	OBJETIVOS.....	92
19.1	GERAL.....	92
19.2	ESPECÍFICOS.....	92
20	MATERIAL E METODO.....	93
20.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	93
20.2	OBTENÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DE DIFERENTES TAMANHOS.....	94
20.3	OBTENÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DE DIFERENTES ESTRUTURAS..	96
20.4	FLUXOGRAMA DA CONSTRUÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA EXÓGENO.....	99
20.4.1	Seqüências de diferentes tamanhos.....	99
20.4.2	Seqüências de diferentes estruturas.....	100
20.5	CONSTRUÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS.....	101
20.5.1	Digestão do DNA.....	101
20.5.2	Purificação do DNA.....	102
20.6	INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COM O DNA.....	103
20.7	AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E OU NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	103
20.8	EXTRAÇÃO DO DNA DOS ESPERMATOZÓIDES.....	104

20.9	DETECÇÃO DOS ÍNDICES DE TRANSFECCÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....	104
20.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	105
21	RESULTADOS.....	106
22	DISCUSSÃO.....	113
23	CONCLUSÕES.....	120
	REFERÊNCIAS.....	121
	ANEXOS.....	132

1 INTRODUÇÃO

Durante a década de 70 tornou-se possível a introdução *in vitro* de DNA exógeno em células eucarióticas. No início dos anos 80, as pesquisas com manipulação genética sofreram grandes avanços, ocorrendo o primeiro registro de sucesso de transferência de DNA exógeno para embriões (BRINSTER et al., 1980) e a obtenção do primeiro mamífero transgênico. Gordon et al. (1980), pela técnica de microinjeção, produziram um camundongo transgênico, espécie que vem sendo utilizada até hoje como padrão para otimizar experimentos em outras espécies (PINKERT, 1993). A habilidade de modificar a expressão gênica pela transgenia, particularmente em mamíferos é um dos mais importantes avanços feitos no campo da biologia aplicada e experimental nas últimas duas décadas (CELEBI et al., 2003).

A transgenia produz modelos para estudos sobre a função e a regulação de genes *in vivo* e os mecanismos envolvidos nos processos de desenvolvimento embrionário normal e patológico (MULLINS; MULLINS, 1996; WALL, 2002). Possibilita também, a produção de xenógrafos viáveis pela geração de órgãos e tecidos humanizados em animais (VANHOVE et al., 1998) e o desenvolvimento de animais com altos valores adicionados, planejados para o uso industrial ou farmacêutico (NIEMANN et al., 1999). O emprego da transgenia faz uma pressão de seleção mais rápida que a seleção genética comum, sem haver a propagação de herança genética indesejável (WALL, 1996).

Entre as formas de produção de animais transgênicos está a infecção retroviral. O genoma do retrovírus pode ser manipulado para carrear DNA exógeno apresentando a vantagem da fácil introdução do transgene. O vírus é naturalmente equipado para carrear material genético exógeno para dentro da célula e integrá-lo

no DNA endógeno de forma unitária, normalmente, uma cópia intacta por genoma de células transgênicas positivas. Entretanto, a técnica, possui limitações como o tamanho do complexo DNA-Proteína viral; a fase do ciclo celular em que a célula hospedeira se encontra, pois somente células em divisão (mitose) são infectadas pelo retrovírus (MILLER et al., 1990) e o tamanho do transgene no qual o comprimento da sequência carregado pelo retrovírus é de 9 a 10 kb (HU; PATHAK, 2000). O vetor retroviral se integra ao DNA do hospedeiro de maneira amplamente aleatória e o resultado é a inconsistência e a irreprodutibilidade de expressão (JAHNER; JAENISCH, 1985), baixa frequência de recombinação homóloga (ELLIS; BERNSTEIN, 1989) e baixa relação entre estabilidade e segurança.

Gordon et al. (1980) demonstraram que o DNA exógeno pode ser introduzido no genoma do zigoto pela simples injeção de uma solução de DNA no pró-núcleo. A microinjeção é a técnica de eleição na maioria dos laboratórios. Nesta técnica, o DNA exógeno se integra ao DNA endógeno aleatoriamente. A principal desvantagem da microinjeção é o alto custo. Embora conceitualmente muito simples, a introdução do DNA no pró-núcleo do zigoto requer equipamentos sofisticados e técnicos treinados. São necessários microscópios de alta resolução, micromanipuladores, incubadoras e micropipetas. Em termos de experiência são necessários vários anos de treinamento para um nível de competência satisfatória.

Outro problema da microinjeção é a baixa eficiência da produção de transgênicos. Um laboratório bem sucedido normalmente microinjeta em torno de 200 zigotos de camundongo por sessão, destes, somente 20 resultam em prole, dos quais provavelmente 2 a 8 serão transgênicos, assim, os melhores resultados para microinjeção de zigotos de camundongo são de 4% (HOGAN et al., 1994). A

eficiência da microinjeção para outros mamíferos é ainda mais baixa, normalmente menos que 1% (WALL et al., 1992).

O principal fator biológico limitante da microinjeção em zigotos bovino, suíno e ovino é a dificuldade de visualização dos pró-núcleos (PN) (SPERANDIO et al., 1996). Zigotos de bovinos e suínos são opacos devido a presença de partículas lipídicas no citoplasma. Zigotos ovinos não têm densas partículas lipídicas citoplasmáticas, entretanto, a visualização do PN também é extremamente difícil. Este efeito parece ser devido ao PN e ao citoplasma terem índice refratário similares. Outras dificuldades com a microinjeção de zigotos de animais domésticos incluem PN pobremente ancorado e uma ausência de indicador de danos no zigoto após a microinjeção (NIEMANN; KUES, 2000; WALL, 1996; WOLF et al., 2000).

O horário da microinjeção é importante, pois a integração do transgene ocorre durante a replicação do DNA, sendo vantajoso microinjetar antes ou durante a fase S, a qual procede a primeira divisão mitótica. Entretanto, em animais domésticos é difícil microinjetar neste período, pois o PN não está evidente (EYESTONE, 1999).

Uma das maneiras de inserir o transgene antes da fase S é introduzi-lo durante a fecundação. Isto pode ser conseguido com a transferência de gene mediada por espermatozóides (TGME). A TGME oferece uma poderosa ferramenta para a transgenia animal e para a biotecnologia nas espécies em que a reprodução ocorre por gametas, principalmente naquelas em que as técnicas convencionais apresentam baixa eficiência, como em suínos e em bovinos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a habilidade de células espermáticas se associarem a moléculas de DNA exógeno e estudar alguns parâmetros que afetam este processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Animais geneticamente modificados são definidos como aqueles que apresentam DNA introduzido por manipulação genética (JACENKO, 1997). Apesar dos primeiros experimentos terem sido conduzidos em ratos, durante os últimos 15 anos, os estudos realizados em animais de laboratório têm sido extrapolados para animais de interesse zootécnico (PINKERT; MURRAY, 1999). Assim, a transferência gênica é empregada na produção de modelos para estudos básicos ou aplicados, no desenvolvimento de animais com alto valor genético adicionado, na produção de animais para uso industrial ou farmacêutico e na produção de órgãos para xenotransplante.

Para a geração destes animais, são utilizadas três metodologias principais: injeção de DNA exógeno em pró-núcleos de zigotos; produção de quimeras por modificação de célula-tronco embrionária e, mais recentemente, transferência nuclear. Para esta última, células somáticas cultivadas *in vitro* são modificadas geneticamente e posteriormente fusionadas em oócitos receptores enucleados (McCREATH et al., 2000). Estudos sobre a produção de animais transgênicos têm sido desenvolvidos intensivamente e com sucesso em camundongos e ratos (CHARREAU et al., 1996). Contudo, a adaptação e a utilização destas técnicas em animais domésticos continuam problemáticas (WALL et al., 1996), apresentando baixa integração do transgene (EYESTONE, 1994).

Para contornar estas dificuldades, o uso de espermatozóides como vetores de DNA exógeno na produção de animais transgênicos tem sido empregado como método alternativo. A primeira evidência de que espermatozóides de mamíferos são

capazes de se ligarem às moléculas de DNA exógeno ocorreu há 35 anos (BRACKETT et al., 1971). No entanto, devido ao início das pesquisas em biologia molecular e em fecundação *in vitro*, estes achados foram esquecidos até o final da década de 80. Arezzo et al. (1989) e Lavitrano et al. (1989) demonstraram que espermatozóides comportam-se como vetores, transferindo DNA exógeno para o interior de oócitos durante o processo de fecundação e mais especificamente que células espermáticas do epidídimo absorvem espontaneamente DNA plasmidial. Estes achados foram confirmados posteriormente por vários grupos (ATKINSON et al., 1991; CASTRO et al., 1991; GAGNÉ et al., 1991; HORAN et al. 1991).

2.1 INTERAÇÃO

A interação do DNA exógeno com células espermáticas é um evento iônico. Lavitrano et al. (1992), ao incubarem espermatozóides com moléculas de DNA entre 150pb e 7000pb, observaram que moléculas maiores se ligam mais eficientemente aos espermatozóides do que moléculas menores. Isto exclui a possibilidade da internalização do DNA no espermatozóide ser devido simplesmente à sua permeabilidade através dos poros, pois desta forma, moléculas pequenas seriam favorecidas em relação às maiores. Tal fato sugere que a carga das moléculas pode ter função importante na interação do DNA exógeno com células espermáticas. De fato, moléculas carregadas negativamente parecem ser favorecidas molecularmente em suas interações específicas, já que uma dada quantidade de carga é necessária para a completa ligação e/ou internalização.

Segundo Camaioni et al. (1992), o DNA é mais comumente detectado no segmento equatorial e na região pós-acrossomal dos espermatozóides de camundongos e uma minoria, na região apical do acrossoma, o mesmo ocorrendo em espermatozóides de bovinos, suínos e humanos (Figura 1). A localização específica da ligação do DNA exógeno na região pós-acrossomal do espermatozóide somado à relevância da carga na interação entre o DNA exógeno e o espermatozóide sugerem a existência de um substrato, possivelmente uma proteína na cabeça dos espermatozóides, no qual moléculas negativamente carregadas podem se ligar.

Figura 1 - Componentes da célula espermática, destacando a região pós-acrossomal, sítio preferencial de ligação do DNA exógeno

Lavitrano et al. (1992) relataram a presença de proteínas de 30 a 35 kDa na cabeça dos espermatozóides. Resultados semelhantes foram encontrados por Zani et al. (1995), que ao pesquisarem o mecanismo envolvido na interação DNA-espermatozóide, identificaram três classes de proteínas como potenciais substratos para a interação do DNA exógeno com o espermatozóide. A primeira classe é uma proteína de baixo peso molecular, abaixo de 20 kDa que foi classificada como protamina. A segunda classe é uma proteína de peso molecular entre 30 e 35 kDa e a terceira classe, de peso molecular em torno de 50 kDa. Estas proteínas estão

presentes na região da cabeça dos espermatozóides atuando como substrato para a ligação do DNA exógeno, formando um complexo estável (SPADAFORA, 1998).

As proteínas de 30-35 kDa representam o mais provável substrato fisiológico para a ligação do DNA, visto que é o único grupo no qual a mobilidade eletroforética é conservada entre espécies de mamíferos, tanto quanto em peixes e equinodermes. Além do mais, é a única classe de proteínas acessíveis ao DNA exógeno em células espermáticas intactas. As proteínas de 30 a 35 kDa purificadas interagem com o DNA exógeno gerando complexo proteína/DNA. Estes resultados sugerem que a interação do DNA exógeno com o espermatozóide é específica e mediada por fatores protéicos aos quais o DNA exógeno se liga para ser carregado para o núcleo.

Outra molécula que atua na ligação do DNA exógeno com o espermatozóide é o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Espermatozóides de camundongo *knockout* para MHC de classe II apresentaram redução na ligação com o DNA exógeno. Embora estas moléculas não tenham sido encontradas em células espermáticas, sua expressão parece ser necessária durante a espermatogênese para produzir células espermáticas capazes de se ligarem ao DNA exógeno (LAVITRANO et al., 1997).

Por outro lado, existem também moléculas que atuam como reguladores negativos no processo de interação do DNA exógeno com o espermatozóide. A alta permeabilidade das células espermáticas ao DNA exógeno faz da fecundação um risco para a identidade genética da prole. Todavia, isto é incomum na natureza. Em contraste ao que acontece em células espermáticas do epidídimo, os espermatozóides do ejaculado na presença de plasma seminal são impermeáveis ao

DNA exógeno, sugerindo que o plasma seminal possui fatores que inibem a permeabilidade dos espermatozóides.

A hipótese da existência de fatores de inibição no plasma seminal foi confirmada por Lavitrano et al. (1992) que, ao acrescentarem quantidades crescentes de plasma seminal, obtiveram taxas decrescentes da ligação dos espermatozóides com o DNA exógeno. O mesmo efeito foi observado por Camaioni et al. (1992), que relataram aumento na porcentagem de espermatozóides ligados ao DNA exógeno, quando o sêmen foi lavado antes da exposição ao DNA. De fato, o plasma seminal possui fatores que antagonizam fortemente a ligação do DNA exógeno, protegendo os espermatozóides. Posteriormente, este fator inibitório de ligação do DNA exógeno às células espermáticas foi identificado e caracterizado como uma glicoproteína, chamado de Fator Inibitório 1 (IF-1). Este provavelmente se une às proteínas ligadoras de DNA exógeno dos espermatozóides, inibindo a interação DNA exógeno-espermatozóides (ZANI et al., 1995). Estas proteínas ligadoras de DNA e o IF-1 aparentemente possuem alta afinidade, sendo que moléculas de IF-1 foram capazes de remover DNA exógeno já associados às proteínas ligadoras de DNA.

Carbalada e Esponda (2001) descreveram dois outros fatores que atuam como reguladores negativos na interação do DNA exógeno com os espermatozóides. O primeiro é o fluido da vesícula seminal, que possui forte atividade de DNase dependente de cálcio e de magnésio. Este achado não é surpresa, pois já foi descrito a presença de DNase no sêmen bovino (TANIGAVA et al., 1975), estando também presente no ejaculado de outras espécies mamíferas (MAMM; LUTWAK-MAMM, 1981). Provavelmente a DNase é a responsável pela maior atividade inibitória no plasma seminal. Carbalada e Esponda (2001) observaram forte

correlação entre a atividade de DNase e a habilidade desta em inibir a interação DNA/espermatozóide. Outro fator é o fluido da próstata ventral que exibe uma moderada atividade inibitória, o qual possui proteínas ligadoras de DNA que se ligam ao DNA exógeno. Entretanto, as concentrações destas proteínas estão em níveis muito baixos, especialmente aquelas entre 50 e 80 kDa. A mais abundante são as proteínas de 25kDa, porém sua afinidade com o DNA exógeno não é muito alta. De qualquer modo, a contribuição destas proteínas na inibição da interação do DNA com os espermatozóides é irrelevante, quando comparadas com a atividade da DNase (CARBALADA; ESPONDA, 2001).

2.2 INTERNALIZAÇÃO

A internalização do DNA no núcleo do espermatozóide ocorre em proporção constante como observado por microscopia eletrônica (FRANCOLINI et al., 1993), onde 15 a 20% do DNA ligado ao espermatozóide foram eficientemente internalizados no núcleo dos espermatozóides e cobertos pela cromatina. A internalização no núcleo também foi confirmada por microscopia confocal (BACHILLER et al., 1991) e análise bioquímica (ATKINSON et al., 1991).

Lavitrano et al. (1997) relataram que glicoproteínas de superfície de membrana, CD4, iniciam um importante papel na internalização do DNA. Camundongos *knockout* para CD4 apresentaram igual eficiência de ligação do DNA exógeno ao espermatozóide em comparação aos camundongos normais, porém foram incapazes de internalizá-los no núcleo. O índice de internalização constante somado à localização específica da ligação do DNA exógeno na região sub-acrossomal do

espermatozóide e o papel das moléculas de CD4 sugerem que a internalização do DNA exógeno no núcleo espermático não é consequência de um processo passivo e incontrolado, mas provavelmente mediado por mecanismos regulatórios.

Zoraqui e Spadafora (1997) observaram que o DNA plasmidial internalizado torna-se fortemente associado ao núcleo, sendo extensivamente reorganizado e sofrendo recombinação com o DNA genômico do espermatozóide. Estes mesmos autores construíram uma biblioteca genômica usando o DNA extraído de espermatozóides previamente incubados com o plasmídeo pSV₂CAT, o que gerou o isolamento de diversos clones em que a seqüência do plasmídeo foi recombinada com o DNA cromossomal de camundongo. Entre os clones, dois foram selecionados aleatoriamente (7 e 8,5 kb) e seqüenciados. Em ambos, a seqüência do DNA plasmidial foi integrada na seqüência genômica de células espermáticas de camundongo. Os locais de integração foram identificados nos dois clones analisados, sendo flanqueados por seqüências idênticas, sugerindo que estes eventos não ocorrem aleatoriamente, mas em locais preferenciais. Uma seqüência de topoisomerase II consenso foi encontrada adjacente aos finais dos locais de integração, sugerindo um possível papel desta enzima no processo de recombinação homóloga.

Pittogi et al. (2000) sugerem a hipótese de que há integração de retroposons e moléculas de DNA exógeno nas nucleohistonas no espaço da cromatina entre dois domínios de protaminas adjacentes. O nucleossoma da cromatina espermática interage com o esqueleto nuclear e é abastecido com a maquinaria enzimática necessária para suportar a integração do DNA.

2.3 FATORES QUE AFETAM A INTERAÇÃO E A INTERNALIZAÇÃO

Não é apenas o DNA exógeno que se liga à região pós acrossomal do espermatozóide, mas também outras macromoléculas carregadas negativamente como a heparina, sulfato de dextran e outras proteínas com ponto isoelétrico menor do que 7 (LAVITRANO et al., 1992). Em particular, a c-phycocyanina, a albumina sérica bovina e a β -lactoglobulina B, os quais o ponto isoelétrico variam de 4,6 a 5,1, possuem ligação preferencial na parte posterior da cabeça, região correspondente ao núcleo, em padrão muito similar aos obtidos com moléculas de DNA. Esta ligação é reversível e moléculas de DNA ligadas ao espermatozóide podem ser removidas quando se aumenta excessivamente a concentração destas moléculas.

A quantidade de DNA exógeno incubado com células espermáticas também possui importante papel na internalização. Plasmídeos extraídos de células espermáticas após a incubação com baixas doses de DNA permaneceram intactos. Porém, o DNA exógeno foi altamente degradado quando células espermáticas foram incubadas com altas doses de DNA exógeno. Estes resultados indicam que o espermatozóide do epidídimo reage contra a invasão do DNA exógeno por meio de atividade de endonuclease, promovendo sua degradação. Quando é incubado com grande quantidade de DNA exógeno, o espermatozóide sofre processo semelhante à apoptose (ativada pela internalização do DNA), degradando o DNA exógeno e o genômico (MAIONE et al., 1997).

A endonuclease, por degradar o DNA exógeno e o endógeno, exerce papel negativo na interação do DNA exógeno com as células espermáticas, razão pela qual se dá atenção à temperatura de incubação dos espermatozóides para não

haver ativação desta enzima em altas temperaturas. O cálcio também possui efeito na interação. Na capacitação espermática, evento dependente de cálcio, ocorre mudanças fisiológicas que tornam o espermatozóide competente para a fecundação e que deve ocorrer em seu ritmo normal. Entretanto, a remoção do plasma seminal (etapa fundamental na interação do DNA exógeno com o espermatozóide) acelera a capacitação espermática, diminuindo a internalização do DNA exógeno no espermatozóide. Uma maneira de inibir esta aceleração é a utilização de meio de incubação sem cálcio, o que permite a capacitação espermática mais lenta na ausência do plasma seminal (LAVITRANO et al., 2003).

A variação individual é outro fator que afeta a interação. Lavitrano et al. (2003) encontraram diferenças que variaram de 9% a 67% nos índices de ligação de DNA exógeno com espermatozóides suínos, em diferentes animais. Esta associação foi alterada quando diferentes concentrações de DNA exógeno foram adicionadas. Entretanto, sob as mesmas condições, a cinética da associação foi similar. Em todos os casos, a associação do DNA exógeno com o espermatozóide iniciou entre 15 e 30 minutos de incubação, seguido de uma fase platô aos 60 minutos. Estes resultados indicam que para cada animal, a ligação do DNA exógeno com o espermatozóide pode ser otimizada. Para maximizar o protocolo de geração de animais transgênicos, é necessário estabelecer quando, por quanto tempo e qual a quantidade de DNA exógeno deve ser adicionada aos espermatozóides, para que sejam eficientemente ligados e internalizados pela maioria das células espermáticas. Isto sugere que os laboratórios que trabalham com transferência gênica mediada por espermatozóides devam realizar vários testes de padronização dos protocolos antes do início dos experimentos.

2.4 METODOLOGIAS PARA A TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES

Para a internalização do DNA exógeno nas células espermáticas, as metodologias mais utilizadas são a incubação dos espermatozóides com moléculas de DNA, a eletroporação e a lipofecção (Figura 2). Na incubação, as moléculas de DNA exógeno se ligam às proteínas ligadoras de DNA (PLDNA) presentes na membrana do espermatozóide, formando o complexo proteína/DNA, que se liga à molécula CD4, ativando a internalização do DNA exógeno.

Figura 2- Representação esquemática dos mecanismos de transfecção de células espermáticas. a) Incubação dos espermatozóides com o DNA exógeno. Após a lavagem do sêmen para a retirada do plasma seminal contendo o fator de inibição IF-1, as moléculas de DNA exógeno se ligam às proteínas ligadoras de DNA (PLDNA) presentes na membrana do espermatozóide, o que ativa a internalização do DNA exógeno mediada por moléculas de CD4, representada pelo complexo DNA/PLDNA/CD4. b) Na lipofecção, a carga positiva do lipossomo interage com a carga negativa do DNA exógeno formando lipoplexos que sofrem endocitose, sendo carregados para o núcleo. c) Pulsos elétricos alternados na eletroporação, abrem poros na membrana plasmática do espermatozóide facilitando a internalização do DNA exógeno.

Na eletroporação, a corrente gerada por pulso elétrico alternado é capaz de abrir temporariamente poros na membrana celular, facilitando a entrada do material genético nas células. Já na lipofecção, a carga positiva do lipídeo catiônico forma uma interação eletrostática com o fosfato do DNA exógeno, formando o lipoplexo. A carga positiva do lipoplexo forma interação não específica com a carga negativa da superfície celular, ocorrendo endocitose, permitindo a internalização do lipoplexo. Este é então direcionado para próximo da região perinuclear onde ocorre a dissociação, resultando na separação do DNA, o qual entra no núcleo provavelmente por transporte nuclear, dependente de energia.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura contém mais de 70 relatos sobre o sucesso da ligação do DNA exógeno com células espermáticas (Quadro 1). Na maioria destes relatos a transferência e manutenção do transgene após a fecundação são descritas, mostrando a subsequente geração de animais viáveis (F_0), contendo o transgene. Em alguns casos também é citada a transmissão do transgene para a prole (F_1) ou adiante (SMITH; SPADAFORA, 2005).

Entretanto, a TGME ainda não está bem estabelecida como forma confiável de manipulação genética. Um aspecto significativo é que a integração estável do transgene tem sido detectada em níveis baixos nos protocolos de TGME. A baixa frequência de integração estável no genoma, a frequência de modificação fenotípica e a transgenia total (incluindo características transmitidas de forma epissomal)

podem variar de 0 a 100%. Maione et al. (1998), em 75 experimentos, produziram 1755 fetos de camundongo dos quais 130 transgênicos, representando 7% do total. A eficiência não foi homogênea entre os experimentos, pois os 130 camundongos transgênicos foram originados em 13 dos 75 experimentos. Entre os 13 experimentos, a eficiência variou de 4 a 100%.

Devido a esta grande variação nos índices de integração do DNA exógeno ao genoma hospedeiro, a TGME não é considerada um método bem estabelecido de transgenia comparada à microinjeção pró-nuclear ou às células tronco embrionárias (produção de quimeras).

Porém, oferece vantagens quando utilizada em animais nos quais a microinjeção ou a utilização de células tronco embrionárias são menos eficientes. Este método não necessita de equipamentos caros nem habilidade na micromanipulação. Adicionalmente, a TGME permite a produção de animais transgênicos em massa, uma vez que grande quantidade de zigotos pode ser modificada coletivamente numa única etapa. Esta técnica poderia ser executada no campo, em programas de inseminação artificial ou em laboratórios que utilizam fecundação *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de espermatozóides, podendo ser aplicado em todas as espécies cuja reprodução é mediada por gametas.

A integração epissomal pode ser atrativa em futuras pesquisas de terapia gênica. Segundo Smith; Spadafora (2005), a não integração do DNA exógeno é na maior parte das vezes propagada como estrutura extra-cromossomal durante o desenvolvimento embrionário, mantida nos tecidos de animais adultos, sem interrupção da integridade do genoma hospedeiro, sugerindo que a terapia gênica, em particular em embriões e fetos, pode se tornar uma realidade futura. O potencial uso da TGME na terapia gênica embrionária é teoricamente aceitável, considerando

que transgenes parecem persistirem melhor no estágio inicial de desenvolvimento, possivelmente devido ao seu estado epissomal. Entretanto, a natureza especulativa desta possibilidade deve ser reconhecida.

Espécie	Metodologia	Referência
Camundongo	Incubação	Lavitrano et al., 1989
	Incubação	Maione et al., 1998
	Incubação	Chang et al., 2002
Bovino	Eletroporação	Gagné et al., 1991
	Incubação	Schellander et al., 1995
	Incubação	Sperandio et al., 1996
	Lipofecção	Rotmann et al., 1996
	Eletroporação	Rieth et al., 2000
Suíno	Incubação	Sperandio et al., 1996
	Incubação	Habrova et al., 1996
	Incubação	Lavitrano et al., 2003
Coelho	Incubação	Brackett et al., 1971
	Incubação	Kuznetsov; kuznetsova, 1995
	Lipofecção	Rotman et al., 1996
	Lipofecção	Wang et al., 2003
Salmão	Eletroporação	Sin FYT et al., 2000
	Eletroporação	Symonds et al., 1994
Zebrafish	Incubação	Khoo et al., 1992
	Eletroporação	Patil; khoo, 1996
Carpa	Incubação	Zkong et al., 2002
Tilápia	Eletroporação	Mueller et al., 1992
Galinha	Lipofecção	Rotman et al., 1991
	Incubação, Eletroporação e Lipofecção	Nakanishi; Iritani, 1993
	Lipofecção	Yang et al., 2004
Ouriço do mar	Incubação	Arezzo, 1989
	Eletroporação	Tsai et al., 1997

Quadro 1-Resumo dos resultados na literatura sobre a transferência gênica mediada por espermatozóide

A interação do DNA exógeno com células espermáticas também tem revelado funções inesperadas e atividades metabólicas nestas células, que são de outra maneira, convencionalmente consideradas silenciosas. A internalização nuclear do DNA exógeno inicia a ativação metabólica de uma variedade de enzimas endógenas, a qual causa a reorganização das seqüências de DNA exógeno e catalisa a sua recombinação com o DNA do espermatozóide (MAGNANO et al., 1998).

Embora a TGME tenha alto índice de integração epissomal, existem vários relatos da produção de animais transgênicos utilizando esta técnica com integração estável no genoma hospedeiro (existem mais de 30 relatos de sucesso dos quais 25% destes mencionam a transmissão do transgene para F₁ ou adiante). Além disto, esta técnica apresenta vantagens como baixo custo, simplicidade, capacidade de produção de animais transgênicos em alta escala, possibilidade de ser aplicada ao campo em futuro próximo e perspectiva para uso na terapia gênica. Isto faz com que vários pesquisadores estudem a TGME com finalidade de aumentar sua eficiência, tornando-a estabelecida e confiável, apresentando alto índice de integração estável.

CAPÍTULO 1

**Avaliação da influência do DNA exógeno e do tempo de
incubação sobre as características morfológicas das
células espermáticas**

RESUMO

FEITOSA, W. B. Avaliação da influência do DNA exógeno e do tempo de incubação sobre as características morfológicas das células espermáticas.

A viabilidade de espermatozóides bovinos durante a incubação com ou sem DNA exógeno foi avaliada. Os espermatozóides foram incubados na concentração de 5×10^6 /ml com ou sem 500ng do plasmídeo pEYFP-Nuc e a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial foram avaliados respectivamente pelas sondas fluorescentes Iodeto de propídeo, Hoechst 33342, FITC-PSA e JC-1 às 0; 1; 2; 3 e 4 horas de incubação. Os resultados mostraram que não houve efeito da adição do DNA exógeno na viabilidade espermática. Entretanto, foi observado efeito do tempo de incubação sobre os parâmetros espermáticos. Quando todos os parâmetros foram avaliados simultaneamente houve redução nos índices de espermatozóides classificados como os de maior viabilidade, de 58,7% à 0 Hora para 7,5% após 4 horas de incubação. Os espermatozóides classificados como os de pior viabilidade aumentaram de 4,6% à 0 hora para 25,9% após 4 horas de incubação. Da mesma forma, quando os parâmetros foram avaliados separadamente houve redução na integridade das membranas plasmática e acrossomal e no potencial de mitocôndria ao longo da incubação. Os resultados indica que o DNA exógeno não causa efeito deletério na viabilidade espermática, mas que a viabilidade é influenciada pelo tempo de incubação.

Palavras-chave: Viabilidade espermática. DNA exógeno. Tempo de incubação.

Weber Beringui Feitosa

3 INTRODUÇÃO

A habilidade de modificar a expressão gênica pela transgenia, particularmente em mamíferos, é um dos mais importantes avanços feitos no campo da biologia aplicada e experimental nas últimas duas décadas (CELEBI et al., 2003). A microinjeção de DNA exógeno no pró-núcleo do zigoto é uma das técnicas mais populares para a produção de animais transgênicos. Entretanto, ela é uma técnica cara, de alta complexidade e de baixa eficiência quando extrapolada para animais de produção. Estas dificuldades têm levado pesquisadores a procurarem métodos mais simples e mais eficientes para a produção de animais transgênicos nestas espécies.

A transferência gênica mediada por espermatozóide (TGME), por ser uma técnica simples, de baixo custo e que teoricamente pode ser aplicada em todas as espécies que se reproduzem por meio de gametas vem chamando a atenção dos pesquisadores. Entretanto, a TGME é apresenta resultados variados e com pouca repetibilidade.

A maioria dos trabalhos de TGME foca apenas a interação do DNA exógeno com as células espermáticas. Poucos avaliam a influência da viabilidade espermática na associação destas células com o DNA exógeno.

Um maior tempo de incubação apresenta maiores índices de associação do DNA exógeno com células espermáticas e de internalização no núcleo (CASTRO et al., 1990; FRANCOLINE et al., 1993). Contudo, pode causar danos à viabilidade espermática reduzindo as chances de fecundação e conseqüentemente menores

índices de embriões transgênicos. O entendimento da ação do tempo de incubação e da adição do DNA exógeno na viabilidade espermática pode reduzir a variabilidade dos resultados e incrementar os índices de transfecção destas células.

4 HIPÓTESE

A associação do DNA exógeno não altera a viabilidade das células espermáticas durante o período de incubação.

5 OBJETIVOS

Para confirmar esta hipótese, os objetivos deste trabalho foram:

5.1 GERAL

Avaliar o efeito do DNA exógeno na viabilidade espermática durante o período de incubação

5.2 ESPECÍFICO

1. Avaliar o efeito do DNA exógeno na integridade das membranas plasmática e acrossomal e no potencial de membrana mitocondrial durante 0; 1; 2; 3 e 4 horas de incubação.
2. Determinar o melhor tempo de incubação em relação à viabilidade espermática

6 MATERIAL E MÉTODO

Para realização deste trabalho, o material e a metodologia utilizada foram descritos a seguir:

6.1 OBTENÇÃO DO DNA EXÓGENO

Neste experimento foi utilizado o plasmídeo pEYFP-Nuc, (Clontech, BD Biosciences, Califórnia, EUA). O pEYFP-Nuc (Figura 3) codifica uma variante verde-amarela do gene da proteína verde fluorescente (GFP) da *Aequorea victoria*.

Figura 3 – Plasmídeo pEYFP-Nuc, Clontech (BD Biosciences)

6.1.1 Transformação das bactérias

O plasmídeo pEYFP-Nuc, na concentração de 500ng, foi adicionado às bactérias DH5 α competentes (F'phi80d/lacZ delta(lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, m k+) *phoA supE44 lambda-thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZdeltaM15 Tn10(tetr)*) e incubados por 30 minutos no gelo, 2 minutos a 42°C e 5 minutos no gelo. À mistura foram adicionados 450 μ l de meio 2YT e incubados por 90 minutos a 37°C, sob leve agitação.

As bactérias transformadas foram espalhadas sobre placas de Petri contendo 50ml de meio 2YT-ágar (Anexo E) contendo 1mg/ml de Kanamicina e incubadas em estufa a 37°C, por 12 horas. As colônias resistentes foram colhidas da placa e inoculadas em 2ml de meio 2YT (Anexo E) por 12 horas a 37°C, sob leve agitação. Após a incubação, a cultura foi transferida para 10 ml de meio 2YT e incubadas por 12 horas a 37°C, sob leve agitação, sendo então transferidas para 100 ml de meio 2YT e incubadas por mais 12 horas a 37°C, sob leve agitação.

6.1.3 Extração do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o EndoFree® Plasmid Maxi Kit (QUIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo o manual do fabricante. Detalhadamente, centrifugou-se 200ml de cultura (item 6.1.2) a 6000g por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o meio foi retirado e o sedimento ressuspendido, com o auxílio de

uma pipeta, em 10 ml de solução P1. Posteriormente foram adicionados 10 ml de solução P2, misturados por inversão e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 10ml de solução P3, misturada gentilmente até a formação de um precipitado. O precipitado foi transferido para uma seringa contendo filtro, mantendo-se a saída fechada e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, removeu-se a tampa da seringa e o meio foi filtrado em tubo de 50 ml. Ao filtrado foram adicionados 2,5 ml de solução ER, misturados por inversão e incubados em gelo por 30 minutos. O meio foi então transferido para uma seringa contendo resina e filtrado por gravidade. A resina da seringa foi lavada duas vezes com 30 ml de solução QC. O DNA da resina foi eluído em 15 ml de solução QN. O DNA foi então precipitado com 10,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente e centrifugado a 15000g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi retirado, o sedimento (DNA) lavado em 5 ml de etanol 70% e centrifugado a 15000g por 10 minutos. Após a centrifugação o sedimento foi seco por 10 minutos e dissolvido em solução de T.E.

Após a extração, o meio contendo o DNA plasmidial foi homogeneizado e 1 µl foi retirado e adicionado em solução contendo 1µl de sacarose, 1µl de azul de bromofenol e 7µl de água. A solução foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão TBE (Anexo E), por 1 hora a 100V, corado com brometo de Etídio e visualizado sob luz ultravioleta. A intensidade da banda contendo o DNA plasmidial foi comparada a intensidade da banda formada por 4µl de Low DNA Mass Ladder ® (Invitrogen, Califórnia, EUA) adicionado de 1 µl de sacarose, 1µl de azul de bromofenol e 4µl de água, sendo estimada a quantidade de DNA/µl de solução.

Uma alíquota de 12,5µl do plasmídeo extraído (item 6.1.3) foi submetido à digestão com 0,5µl da enzima de restrição *Bam*H 1 e 1,5µl de tampão E (Promega, Madison. EUA), para linearização.

6.2 INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COM O DNA EXÓGENO

O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos e submetido ao gradiente Percoll (45 e 90% Anexo C) a 600g por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado e lavado em meio TALP-sêmen (Anexo A) a 200g por 5 minutos para retirada de todo o resíduo de Percoll. Após a lavagem, foram retirados 2µl de sêmen para cálculo da motilidade e 2µl para cálculo da concentração espermática.

Os espermatozóides foram suspensos em meio de fecundação (Anexo B) na concentração de 5×10^6 /ml e incubados a 39°C e 5% de CO₂ em ar com 500 ng/ml de pEYFP-Nuc. O sêmen foi incubado com ou sem DNA (pEYFP-NUC) em 5 diferentes tempos de incubação (0, 1, 2, 3 e 4 horas), sendo realizado 10 repetições.

6.3 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para verificar a integridade da membrana plasmática foram utilizadas as sondas iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342 (H342). A membrana plasmática íntegra é impermeável ao IP. Em espermatozóides com lesão na membrana plasmática, o IP penetra e cora o núcleo em vermelho. Já em relação ao H342 existe permeabilidade de membrana, corando de azul o núcleo dos espermatozóides. Para verificar a integridade do acrossomo foi utilizada a aglutinina de *Psium sativum* conjugada com isotiocionato fluoresceína (FITC-PSA), que cora em verde a região do acrossomo dos espermatozóides que sofreram reação acrossomal. A avaliação da função mitocondrial foi verificada pela sonda JC-1, que cora em vermelho as mitocôndrias com alto potencial de membrana e em verde as com baixo potencial.

Foram adicionados 2 μ l de Hoechst 33342 em 150 μ l de sêmen diluído em TALP (5×10^6 spz/ml), incubados por 10 minutos a 37°C. Após este período foram adicionados 3 μ l de iodeto de propídeo, 2 μ l de JC-1 e 50 μ l de FITC-PSA e incubados novamente por 10 minutos a 25°C. Após a incubação, 10 μ l da solução foram colocadas entre lâmina e lamínula, sendo o excesso retirado com auxílio de lenço de papel. Foram avaliadas 200 células no microscópio de epifluorescência (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando filtros com excitação de 355, 490 e 520nm e emissão de 465, 525 e 610nm, respectivamente.

Os espermatozóides foram classificados em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, descritas a seguir:

Classe 1 - Membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e alto potencial de mitocôndria.

Classe 2 - Membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e baixo potencial de mitocôndria.

Classe 3 - Membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e alto potencial de mitocôndria.

Classe 4 - Membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de mitocôndria.

Classe 5 - Membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e alto potencial de mitocôndria.

Classe 6 - Membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e baixo potencial de mitocôndria.

Classe 7 - Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de mitocôndria.

Classe 8 - Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de mitocôndria.

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos foram analisados utilizando o programa estatístico MINITAB Realease 14 Statistical Software (Pennsylvania, EUA). Previamente os dados foram verificados quanto à homogeneidade e à distribuição das variáveis. As variáveis que não atenderam estas premissas foram transformadas logaritmicamente (Log_{10}), sendo então submetidos à análise de variância e comparados pelo teste Tukey, com nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

Não houve efeito da adição do DNA exógeno sobre a motilidade espermática, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial e em nenhum dos tempos de incubação. Entretanto, foi observado efeito do tempo de incubação sobre os parâmetros de viabilidade espermática como descrito nas tabelas 1 e 2. Da mesma maneira, quando as classes de espermatozóides foram agrupadas em categorias: integridade da membrana plasmática (IMP) integridade do acrossoma (IA) e potencial da membrana mitocondrial (PMM) houve efeito do tempo de incubação sobre a viabilidade espermática (Tabela 3). A variação IMP, IA e PMM durante a incubação sem ou com DNA exógeno está ilustrada nos gráficos 1; 2 e 3, respectivamente.

O tempo que apresentou maior motilidade espermática foi o de 1 hora de incubação, no qual os espermatozóides incubados sem DNA exógeno apresentaram 58% de motilidade e os espermatozóides incubados com DNA exógeno tiveram 57,5% de motilidade. Entretanto, ambos foram inferiores à motilidade encontrada no grupo controle (0 hora) que apresentaram 79,5% de motilidade (Tabela 1).

Tabela 1 – Motilidade média dos espermatozóides incubados com ou sem DNA - São Paulo – 2006

TEMPO	0 HORA (%)	1 HORA (%)	2 HORAS (%)	3 HORAS (%)	4 HORAS (%)
Sem DNA	79,5±8,0 ^{aA}	58±16,2 ^{bA}	35±14,3 ^{cA}	15,5±10,4 ^{dA}	4,5±5,0 ^{dA}
Com DNA	79,5±8,0 ^{aA}	57,5±16 ^{bA}	34,5±13,2 ^{cA}	15±8,5 ^{dA}	4,5±5,0 ^{dA}

Letras minúsculas representam comparações entre as colunas dentro da mesma linha. Letras maiúscula representam comparações entre as linhas dentro da mesma coluna. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os espermatozóides da classe 1 foram observados em maior quantidade com 1 hora de incubação tanto na incubação sem DNA (35,7%) quanto na com DNA exógeno (35,1%). Contudo, o controle (0 hora) apresentou maior quantidade (58,7%). As classes 2, 3 e 4 não apresentaram variação ao longo do tempo de incubação. A classe 5 foi observada em maior quantidade às 0 hora (14%), 1 hora (20,2%) e 2 horas (18,1%) de incubação sem DNA e à 1 hora (22,3%) quando incubado com DNA exógeno. A classe 6 esta presente em maior quantidade às 2 (28,1%), 3 (37,1%) e 4 horas (45,7%) quando incubados sem DNA, e às 3 (40,1%) e 4 horas (41,6%), quando incubados com DNA exógeno. A classe 7 não apresentou variação durante as 4 horas de incubação. A classe 8 foi encontrada em maior quantidade às 3 e 4 horas de incubação, tanto sem DNA (22,6 e 25,9%, respectivamente), quanto com DNA (23,1 e 30,3%, respectivamente) (Tabela 2 e Figura 4 e 5).

Quando foram agrupados em categorias, os espermatozóides com membrana plasmática íntegra foram observados em maior quantidade à 0 hora (68,6%) e 1 hora de incubação (47,8%, sem DNA e 45,9%, com DNA exógeno) (Tabela 3 e Gráfico 1). Os espermatozóides com membrana acrossomal íntegra estavam em maior quantidade à 0 hora (85,6%), 1 hora de incubação sem DNA (75,3%) e com DNA (78,1%) e às 2 horas de incubação sem (76,2%) DNA exógeno (Tabela 3 e Gráfico 2). Os espermatozóides com alto potencial de mitocôndria também foram observados em maior quantidade à 0 hora (81,9%) e 1 hora de incubação (68,4%, sem DNA e 69,2%, com DNA) (Tabela 3 e Gráfico 3).

Tabela 2 – Porcentagem dos espermatozoides incubados com ou sem DNA em diferentes tempos corados com iodeto de propídeo, Hoechst 33342, JC-1 e FITC-PSA distribuídos em cada uma das 8 classes - São Paulo – 2006

Classes	0 Hora (%)		1 Hora (%)		2 Horas (%)		3 Horas (%)		4 Horas (%)	
	S/DNA	C/DNA	S/DNA	C/DNA	S/DNA	C/DNA	S/DNA	C/DNA	S/DNA	C/DNA
Classe 1	58,7±5,6 ^a	58,7±5,6 ^a	35,7±11,6 ^b	35,1±11,5 ^b	19,4±10,7 ^c	18,3±9,0 ^c	10,3±5,4 ^{cd}	11,2±8,6 ^{cd}	7,5±7,1 ^d	6±3,2 ^d
Classe 2	6,6±4,4	6,6±4,4	9±3,5	8,1±4,3	10,7±6,1	8,2±6,5	10,3±5,5	9±1,5	7,4±5,6	5,6±4,0
Classe 3	2,5±3,4	2,5±3,4	1,9±2,1	1,7±2,1	0,4±0,9	1±1,1	1,1±0,8	0,6±1,5	0,3±0,4	0,3±0,5
Classe 4	0,7±0,7	0,7±0,7	1,2±1,1	1,1±0,9	0,8±1,5	0,5±0,8	0,8±0,7	0,3±0,4	0,3±0,4	0,2±0,3
Classe 5	14±6,1 ^{ab}	14±6,1 ^a	20,2±5,7 ^a	22,3±4,0 ^b	18,1±7,7 ^a	13,1±7,5 ^a	9,5±4,6 ^b	9,6±3,9 ^a	7,6±7,4 ^b	7,8±5,3 ^a
Classe 6	6,3±5,1 ^a	6,3±5,1 ^a	10,4±3,9 ^a	12,7±4,8 ^a	28,1±15,9 ^b	27,9±11,5 ^b	37,1±12,7 ^b	40,1±12,6 ^{bc}	45,7±12,3 ^b	41,6±1,8 ^c
Classe 7	6,6±6,2	6,6±6,2	10,5±6,4	10,2±5,9	9,9±7,1	14,5±8,7	8,3±6,3	6,1±6,9	5,3±4,4	8,2±5,8
Classe 8	4,6±3,2 ^a	4,6±3,2 ^a	11,1±6,5 ^{ab}	8,8±3,7 ^{ac}	12,6±5,6 ^b	16,4±5,9 ^{bc}	22,6±6,8 ^c	23,1±8,2 ^{bd}	25,9±7,9 ^c	30,3±8,9 ^d

Comparações entre tempos de incubação dentro de cada tratamento (incubação sem DNA ou incubação com DNA) na mesma linha. Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05)

Tabela 3 – Porcentagem dos espermatozóides incubados com ou sem DNA exógeno em diferentes tempos, corados com iodeto de propídeo, Hoechst 33342, JC-1 e FITC-PSA - São Paulo – 2006

Categoria	Tratamento	0 Hora (%)	1 Hora (%)	2 Horas (%)	3 Horas (%)	4 Horas (%)
Integridade de Membrana Plasmática (IMP)	<i>C/DNA</i>	68,6±7,0 ^a	45,9±10,8 ^b	28±9,4 ^c	21,2±9,7 ^{cd}	12,2±6,8 ^d
	<i>S/DNA</i>	68,6±7,0 ^a	47,8±11,0 ^b	31,5±10,2 ^c	22,5±4,8 ^{cd}	15,6±9,8 ^d
Integridade de Acrossomo (IA)	<i>C/DNA</i>	85,6±10,3 ^a	78,1±9,8 ^{ab}	67,5±10,1 ^{ab}	69,9±10,5 ^b	61,0±13,3 ^b
	<i>S/DNA</i>	85,6±10,3 ^a	75,3±10,6 ^{ab}	76,2±10,9 ^{bc}	67,3±11,4 ^{bc}	68,25±8,5 ^c
Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)	<i>C/DNA</i>	81,9±5,7 ^a	69,2±8,0 ^a	46,9±18,4 ^b	27,4±13,6 ^c	22,3±11,7 ^c
	<i>S/DNA</i>	81,9±5,7 ^a	68,4±8,9 ^a	47,8±17 ^b	29,2±11,3 ^c	20,6±14,7 ^c

Letras diferentes entre colunas representam diferenças significativas (p<0,05).

Gráfico 1 – Viabilidade dos espermatozoides em diferentes tempos de incubação, com ou sem DNA (espermatozoides vivos corados pelo Hoechst (Σ das classes 1, 2, 3 e 4) e mortos pelo iodeto de propídeo (Σ das classes 5, 6, 7 e 8). Letras sem negrito representam as incubações sem DNA. Letras em negrito representam as incubações com DNA. Letras maiúsculas representam espermatozoides com lesão na membrana plasmática. Letras minúsculas representam espermatozoides sem lesão na membrana plasmática. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) - São Paulo – 2006

Gráfico 2 – Reação acrossômica dos espermatozoides incubados em diferentes tempos, com ou sem DNA (espermatozoides reagidos corados em verde pelo PSA-FITC (Σ das classes 3, 4, 7 e 8) e não reagidos sem coloração (Σ das classes 1, 2, 5 e 6). Letras sem negrito representam as incubações sem DNA. Letras em negrito representam as incubações com DNA. Letras maiúsculas representam espermatozoides com reação acrossomal. Letras minúsculas representam espermatozoides sem reação acrossomal. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) - São Paulo – 2006

Gráfico 3 – Potencial de ação mitocondrial dos espermatozoides incubados em diferentes tempos, com ou sem DNA (espermatozoides corados em verde com baixo potencial (Σ das classes 2, 4, 6 e 8) e vermelho com alto potencial pelo JC-1 (Σ das classes 1, 3, 5 e 7). Letras sem negrito representam as incubações sem DNA. Letras em negrito representam as incubações com DNA. Letras maiúsculas representam espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial. Letras minúsculas representam espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) - São Paulo – 2006

Figura 4 – Categoria dos espermatozoides de acordo com a fluorescência emitida. A) Classe 1 – Membrana plasmática e acrossomal íntegra e com alto potencial de mitocôndria. B) Classe 2 - Membrana plasmática e acrossomal íntegra e com baixo potencial de mitocôndria. C) Classe 3 - Membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada e com alto potencial de mitocôndria. D) Classe 4 - Membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada e com baixo potencial de mitocôndria. Microscopia de Epifluorescência. Aumento 400X - São Paulo – 2006

Figura 5 – Categoria dos espermatozóides de acordo com a fluorescência emitida. A) Classe 5 – Membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra e com alto potencial de mitocôndria. B) Classe 6 - Membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra e com baixo potencial de mitocôndria. C) Classe 7 - Membrana plasmática e acrossomal lesadas e com alto potencial de mitocôndria. D) Classe 8 - Membrana plasmática e acrossomal lesadas e com baixo potencial de mitocôndria. Microscopia de Epifluorescência. Aumento 400X - São Paulo – 2006

8 DISCUSSÃO

Na otimização dos protocolos de TGME para a geração de animais transgênicos existe a necessidade de se estabelecer por quanto tempo os espermatozóides devem ser incubados com moléculas de DNA exógeno. Os trabalhos que abordam o tempo de incubação tratam apenas do índice de transfecção. Entretanto, pouco se sabe sobre a viabilidade espermática durante a incubação ou sobre o efeito da adição do DNA exógeno nos espermatozóides.

Um tempo maior de exposição dos espermatozóides às moléculas de DNA exógeno pode aumentar os índices de transfecção. Porém, pode causar danos às células espermáticas, ocasionando menor índice de embriões.

No presente estudo, a adição do DNA exógeno aos espermatozóides não afetou a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial em nenhum dos tempos de incubação, quando comparados aos espermatozóides incubados sem DNA. Estes resultados se contrapõem aos de Anzar e Buhr (2006) que observaram redução na integridade da membrana dos espermatozóides quando associados ao DNA exógeno. Contudo, confirmam os resultados de Lavitrano et al. (1989) que não observaram alterações morfológicas nos espermatozóides causadas pela incubação com DNA exógeno.

Em contrapartida, foi observado efeito do tempo de incubação na viabilidade espermática em todos os parâmetros avaliados.

Apesar da adição do DNA exógeno não ter afetado a viabilidade espermática há na literatura vários relatos de que a viabilidade espermática influencia a interação dos espermatozóides com moléculas de DNA exógeno e a fecundação.

O tempo de incubação reduziu a motilidade média dos espermatozóides incubados com e sem DNA exógeno. A redução da motilidade durante a incubação pode ter um papel importante na transfecção das células espermáticas. Segundo Horan et al. (1991), espermatozóides com boa motilidade possuem maior habilidade de ligação com o DNA exógeno, quando comparados aos espermatozóides sem motilidade.

Entretanto, ainda não se sabe se este aumento é explicado por mecanismos de interação e de internalização do DNA exógeno mais eficientes nas células móveis ou se é consequência da maior exposição dos espermatozóides móveis às moléculas de DNA exógeno, favorecendo assim, a interação destas moléculas com os espermatozóides.

A redução da motilidade também influencia a fecundação, no qual existe forte correlação entre a motilidade espermática e a fertilidade, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HOLT et al., 1997; KJAESTAD et al., 1993; TANGHE et al., 2002). Assim, um tempo de incubação que tenha efeito negativo menor sobre a motilidade dos espermatozóides, além de melhorar a eficiência da transfecção, também evita a redução dos índices de fecundação.

A interação, internalização e integração do DNA exógeno às células espermáticas não é meramente consequência de um processo passivo e incontrolado, mas regulado por mecanismos mediados por fatores específicos que ativam metabolicamente estas células (SMITH; SPADAFORA, 2005), portanto dependente de energia. Em vista disto, neste trabalho, avaliou-se o potencial de

membrana mitocondrial dos espermatozóides incubados com ou sem DNA exógeno durante as 4 horas de incubação.

Pelo fato das mitocôndrias gerarem energia para suportar a motilidade espermática, mudanças no potencial de membrana mitocondrial podem ser um bom indicador de motilidade, sem precisar avaliá-la de forma direta e subjetiva (ERICSSON et al., 1993). Como a respiração aeróbica é pré-requisito para a sobrevivência de uma célula, os testes para a função mitocondrial geralmente são altamente correlacionados com a viabilidade. Alguns marcadores mitocondriais tais como a Rhodamina 123 e o JC-1, podem identificar os espermatozóides com diferentes graus de função mitocondrial (JOHNSON et al., 1981; TROIANO et al., 1998; WINDSOR; WHITE, 1993;). Estas avaliações são mais elucidativas, pois são capazes de determinar graus de função celular (alto ou baixo potencial) ao invés de determinar ausência ou presença de motilidade, havendo benefícios destes testes sobre os testes padrões de viabilidade.

Entretanto, neste trabalho, ao se avaliar o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozóides, não foi observado efeito da adição do DNA exógeno quando comparado aos espermatozóides incubados sem DNA, em nenhum dos tempos de incubação. Inicialmente, estes resultados sugerem que o mecanismo que regula a TGME é um evento que não depende de energia ou que o gasto energético é baixo a ponto de não ser detectado pela sonda fluorescente JC-1.

Como em outros tipos celulares, a mitocôndria produz ATP a partir da respiração aeróbica. Porém, a fosforilação oxidativa das mitocôndrias não é a única fonte de ATP que supre as exigências energéticas da motilidade flagelar. Vários estudos mostram que a glicólise realizada ao longo da peça principal e não a fosforilação oxidativa das mitocôndrias na peça intermediária é a fonte mais

importante de ATP para a cauda (BRADLEY et al., 1996; BUNCH et al., 1998; MORI et al., 1998; TRAVIS et al., 1998; WESTHOFF; KAMP, 1997).

A adição do DNA exógeno, neste trabalho, pode não ter influenciado o potencial de membrana mitocondrial, pois a energia gasta na TGME pode ter sido proveniente da glicólise ou de um direcionamento da energia produzida pela oxidação mitocondrial, enquanto que a motilidade é suprida energeticamente pela glicólise.

Para avaliar a integridade da membrana plasmática geralmente são utilizadas sondas fluorescentes as quais a membrana é impermeável. As células que não fluorescem com estas sondas são consideradas íntegras. Diferentes sondas fluorescentes que trabalham com este princípio tem sido utilizadas em células espermáticas, entre elas o Hoechst 33258 (MCLAUGHLIN et al., 1992), Yo-pro-1 (HARRISON et al., 1996) e o Iodeto de Propídeo (GARNER et al., 1986).

Na avaliação da integridade da membrana plasmática, não houve efeito da adição do DNA exógeno em nenhum tempo de incubação. Contudo, foi observado efeito do tempo de incubação. No grupo controle, 68,6% dos espermatozóides apresentaram membrana plasmática íntegra reduzindo para 45,9 e 47,8%, à 1 hora de incubação, 28 e 31,5% às 2 horas, 21,2 e 22,5 às 3 horas e 12,2 e 15,6% às 4 horas de incubação com e sem DNA exógeno, respectivamente.

A interação do espermatozóide com o oócito e a subsequente fecundação são processos precisamente regulados no qual a membrana plasmática do espermatozóide possui importante papel. A membrana plasmática é altamente polarizada e reorganizada dinamicamente durante a capacitação e o processo de fecundação. Adicionalmente, ancora organelas e componentes intracelulares e por sua característica semipermeável mantém o gradiente químico de íons e de outros

componentes solúveis. As proteínas específicas da membrana plasmática facilitam o transporte de glicose e de frutose do ambiente extracelular para dentro do espermatozóide (ANGULO et al., 1998; BURANT; DAVIDSON, 1994; SCHURMANN, et al., 2002). Estes transportes são fontes de substratos energéticos indispensáveis para o espermatozóide maduro, onde aproximadamente 90% do ATP é produzido pela glicólise, indicando a importância da integridade da membrana plasmática no transporte de glicose e frutose, que são fontes de energia indispensáveis para os espermatozóides (MARIN et al., 2003; MUKAI; OKUNO, 2004). Se a membrana espermática não está funcionalmente intacta, o espermatozóide é considerado deteriorado (morto) e é incapaz de fecundar in vivo e in vitro (SILVA; GADELLA 2006).

A membrana plasmática também apresenta importante papel na interação do DNA exógeno com os espermatozóides. Atkinson et al. (1991) não observaram diferença na porcentagem de espermatozóides íntegros associados às moléculas de DNA exógeno (18,54%) em comparação com espermatozóides submetidos ao choque térmico (19,2%). Entretanto, observaram diferença no padrão de localização da ligação do DNA exógeno. Na maioria dos espermatozóides vivos, o DNA exógeno se ligou preferencialmente na extremidade da região posterior da cabeça enquanto que na maioria dos espermatozóides mortos a ligação ocorreu na região posterior da cabeça. Já Lavitrano et al. (1989) observaram que somente células vivas são capazes de se associarem com moléculas de DNA exógeno, o que foi confirmado por Castro et al. (1990).

Ao avaliar a integridade da membrana acrossomal, neste experimento, não foi observado efeito da adição do DNA exógeno. Porém, foi observado efeito do tempo de incubação, no qual houve perda da integridade do acrossoma durante as 4 horas

de incubação. Para avaliar a integridade do acrossomo, normalmente é utilizada a lectina conjugada com fluoresceína, sendo a lectina do *Pisum sativum* (PSA) e a lectina do *Arachis hypogaea* (PNA) as mais utilizadas.

Ao contrário do potencial de membrana mitocondrial e da integridade da membrana plasmática, a integridade do acrossoma é o único parâmetro que não influencia a interação do DNA exógeno com as células espermáticas. Horan et al. (1991) observaram que não houve diferença na porcentagem de DNA exógeno associado aos espermatozóides com ou sem reação acrossomal, apresentando uma média de 75% dos espermatozóides associados às moléculas de DNA exógeno.

Embora não exista correlação entre a integridade da membrana acrossomal e os índices de interação do DNA exógeno, a integridade do acrossoma é fundamental para a fecundação. O acrossomo é uma organela secretória de ácidos derivada do aparelho de golgi e do retículo endoplasmático. É preenchido com enzimas hidrolíticas que são organizados em um tipo de matriz no qual a maioria das enzimas são glicosiladas (RAMALHO-SANTOS et al., 2002). A ligação inicial do espermatozóide com a zona pelúcida promove a reação acrossomal resultando na liberação e ativação destas enzimas. Isto, junto com a hipermotilidade adquirida ajudará, o espermatozóide a penetrar a zona pelúcida (HONDA et al., 2002).

O acrossomo deve permanecer intacto antes e durante o trânsito do espermatozóide pelo ístimo da tuba uterina até a zona pelúcida. A reação acrossomal precoce (SILVA; GADELLA, 2006) ou a ausência da reação acrossomal (BIELEFELD et al., 1994) faz com que o espermatozóide não consiga penetrar a zona pelúcida, e conseqüentemente perder a capacidade fecundante.

Os resultados do presente estudo podem ser uma das explicações da existência de uma fase de platô observada na TGME. Segundo Castro et al. (1990) a

interação do DNA exógeno com células espermáticas de bovinos inicia aos 15 minutos de incubação, alcançando uma associação máxima aos 45 minutos, seguida por uma fase platô. Um período de associação máxima também foi observado por Camaione et al. (1992) aos 40 minutos de incubação. Assim esta fase platô coincide com os resultados deste trabalho que demonstraram haver perda da motilidade e da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de mitocôndria durante a incubação, principalmente a partir de 1 hora de incubação.

Visto que, com exceção da integridade da membrana acrossomal, todos os outros parâmetros exercem efeito na interação do DNA exógeno com as células espermáticas, o aumento do tempo de incubação e conseqüentemente a perda da viabilidade espermática, pode reduzir a eficiência da TGME. Adicionalmente deve ser ressaltada a importância destes parâmetros na fecundação, no qual a redução da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de mitocôndria, resultam em redução da fecundação.

Assim, o efeito do tempo de incubação sobre os parâmetros estudados mostrou ser de grande importância para a TGME, uma vez que estes parâmetros influenciam a associação do DNA exógeno com as células espermáticas e a fecundação.

9 CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que:

1) A adição de moléculas de DNA exógeno não afeta a motilidade, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozóides.

2) O tempo de incubação causa redução dos parâmetros avaliados, sendo 1 hora de incubação o tempo no qual os espermatozóides apresentam maior viabilidade.

CAPÍTULO 2

**Efeito do tempo de incubação das células espermáticas
com o DNA exógeno sobre o índice de transfecção e a
indução de apoptose e de
necrose**

RESUMO

FEITOSA, W. B. Efeito do tempo de incubação de células espermáticas com DNA exógeno sobre os índices de transfecção e a indução de apoptose e de necrose - São Paulo – 2006.

O efeito do tempo de incubação dos espermatozóides com moléculas de DNA exógeno sobre o índice de transfecção e indução de apoptose/necrose foram avaliados. Na avaliação dos índices de transfecção, 5×10^6 espermatozóides foram incubados por 60, 90 e 120 minutos com 500ng de DNA exógeno. Para analisar o efeito da adição do DNA exógeno na indução de apoptose/necrose, os espermatozóides bovinos foram incubados na concentração de 5×10^6 sem ou com 500ng de DNA (pEYFP-Nuc) por 60, 90 e 120 minutos, corados com as sondas fluorescentes Yo-pro e iodeto de propídeo e analisados por citometria de fluxo. Após as incubações, o DNA dos espermatozóides foi extraído e o DNA do pEYFP-Nuc quantificado por PCR em tempo real. Não houve efeito da adição do DNA exógeno na indução de apoptose/necrose. Quanto aos índices de transfecção, foi observado que aos 120 minutos de incubação 0,0092ng de DNA exógeno estava associado aos espermatozóides, sendo esta associação maior do que aos 60 (0,0066ng) e aos 90 (0,0054ng) minutos. Conclui-se que o aumento no tempo de incubação aumentou a quantidade de DNA exógeno associado às células espermáticas.

Palavras-chave: Tempo de incubação. Apoptose. Espermatozóide. Transferência gênica

10 INTRODUÇÃO

A cinética da interação dos espermatozóides com o DNA exógeno têm sido um dos mecanismos estudados para melhor compreensão e aplicação da transferência gênica mediada por espermatozóides (TGME).

Todavia, os resultados são contraditórios. Francoline et al. (1993), ao avaliarem a cinética de associação do DNA exógeno com os espermatozóides, concluíram que houve aumento da quantidade de DNA associado aos espermatozóides ao longo de 2 horas de incubação. No entanto, outros autores relataram aumento da associação do DNA exógeno com a membrana dos espermatozóides, seguido de fase platô aos 20 minutos de incubação em humanos e aos 40 minutos em bovinos, suínos e ovinos (CAMAIONI et al., 1992). Já Sperandio et al. (1996) relataram saturação na associação do DNA com espermatozóides aos 60 minutos em camundongos e suínos e 30 minutos em bovinos.

Um maior tempo de incubação pode aumentar a quantidade de DNA exógeno associado às células espermáticas. Entretanto, grande quantidade de DNA exógeno associado ou internalizado pode iniciar atividade metabólica nestas células, como a ativação de endonuclease provocando a degradação do DNA exógeno e/ ou endógeno por um processo semelhante à apoptose (MAIONE et al., 1997). Um maior tempo de incubação também causa redução da viabilidade espermática e conseqüentemente a redução dos índices de transfecção dos espermatozóides (ANZAR; BUHR, 2006).

Isto poderia explicar, pelo menos em parte, as diferenças na repetibilidade e eficiência dos protocolos de transferência gênica mediada por espermatozóide em diferentes espécies, animais e laboratórios.

11 HIPÓTESE

O tempo de incubação com o DNA exógeno influencia os índices de transfecção e de indução de apoptose e de necrose em células espermáticas.

12 OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivos:

12.1 GERAL

Avaliar o efeito do tempo de incubação das células espermáticas com o DNA exógeno sobre os índices de transfecção e indução de apoptose e de necrose em células espermáticas

12.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do tempo de incubação e da adição do DNA exógeno na indução de apoptose e de necrose nas células espermáticas
2. Estudar a cinética da transfecção dos espermatozóides em diferentes tempos de incubação
3. Avaliar qual tempo de incubação apresenta melhor índice de transfecção

13 MATERIAL E MÉTODO

Para realização deste trabalho, o material e a metodologia utilizada foram descritos a seguir:

13.1 OBTENÇÃO DO DNA EXÓGENO

O DNA exógeno utilizado neste experimento (pEYFP-Nuc) assim como a transformação das bactérias, extração e quantificação do DNA plasmidial foi realizado como descrito no item 6.1.3 do Capítulo 1.

13.2 INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COM O DNA EXÓGENO

Os espermatozóides preparados conforme descrito no item 6.2 do Capítulo 1 foram ressuspensos em 1ml de meio de fecundação (Anexo A e B) na concentração de 5×10^6 /ml e incubados a 39°C e 5% de CO₂ em ar com 500 ng/ml de pEYFP-Nuc (Clontech, BD Biosciences). O sêmen foi incubado com ou sem DNA (pEYFP-NUC) em 3 diferentes tempos (60, 90 e 120 minutos).

13.3 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E/OU NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

O sêmen após a descongelação foi centrifugado em gradiente Percoll (45/90%), lavado com 3ml de PBS sem cálcio e magnésio (Anexo B) a 200g por 5 minutos, diluído na concentração de 1×10^6 espermatozóides/ml e dividido em quatro grupos. No primeiro grupo o sêmen não foi corado, no segundo corado apenas com o Iodeto de propídeo (IP – [6 μ M] –Sigma), no terceiro grupo com Yo-pro ([100 μ M] - Molecular Probes) e no quarto com IP e Yo-pro. As sondas fluorescentes Yo-pro e IP foram utilizadas, respectivamente, para detectar alterações na permeabilidade da membrana plasmática relacionadas à apoptose ou lesão na membrana plasmática relacionada à necrose.

No primeiro grupo, a amostra foi avaliada pelo citômetro de fluxo (FACScalibur, BD) do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para estabelecer parâmetros iniciais e sofrer alterações de modo que a autofluorescência observada não ultrapassasse 1% dos eventos contados para FL3 (eixo Y, fluorescência vermelha) e 2% para FL1 (eixo X, fluorescência verde). Como observado na figura 7, 99,63% dos eventos encontravam-se no quadrante esquerdo inferior do gráfico, correspondente à zona sem fluorescência.

Após avaliar todas as amostras no citômetro, foram gerados pelo *software* WinMDI 2.8, gráficos de pontos. Os eixos X e Y representaram, em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozóides com alteração de permeabilidade de membrana seletiva ao Yo-pro (eixo X) e a intensidade de fluorescência emitida pelo IP (eixo Y). Foram consideradas positivas para o Yo-pro as amostras com intensidade de fluorescência superior a 10^2 e para o IP aquelas com intensidade superior a 10^1 (MARTIN et al., 2004, 2005).

Figura 7 – Gráfica de pontos resultantes da padronização do citômetro de fluxo para o ensaio de Yo-pro /IP

Estas intensidades foram usadas como origem de retas paralelas ao eixo X e Y que originaram o quadrante superior esquerdo, correspondente às células necrosadas; o superior direito, correspondente às células em necrose inicial/apoptose tardia; o inferior direito, correspondente às células apoptóticas e o

inferior esquerdo correspondente aos espermatozóides vivos (Figura 7). A porcentagem de células em cada quadrante foi computada por ferramenta estatística do próprio software.

Após a incubação com ou sem DNA exógeno, o sêmen foi lavado com 3 ml de PBS sem cálcio e magnésio a 200g por 5 minutos. Um total de 1×10^6 células espermáticas diluídas em 1ml de PBS sem cálcio e magnésio foram adicionadas de 2µl de Yo-pro (100µM), incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 10µl de IP (6µM) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Ao término da incubação, as amostras foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

13.4 EXTRAÇÃO DO DNA DOS ESPERMATOZÓIDES

Os espermatozóides após 60, 90 e 120 minutos de incubação com o DNA exógeno (pEYFP-Nuc) foram colocados em poços de gel de agarose 2,5% e submetidos à eletroforese em tampão TBE a 100v para a separação dos espermatozóides e das moléculas de DNA não associadas às células espermáticas presentes no meio de incubação, evitando falsos positivos. A eletroforese durou o tempo necessário para deslocamento da banda correspondente ao pEYFP-Nuc no gel de agarose (Figura 8).

Figura 8 – Esquema representativo da separação do DNA exógeno não associado aos espermatozoides por eletroforese. A e B) Meio de incubação contendo os espermatozoides e as moléculas de DNA exógeno em gel de agarose 2,5%. O tampão TBE não deve cobrir o gel para evitar que os espermatozoides saiam dos poços. C) Espermatozoides submetidos à eletroforese para a retirada das moléculas de DNA exógeno presente no meio de incubação não associadas aos espermatozoides. D) Retirada dos espermatozoides livres de DNA não associados às células espermáticas

Após a eletroforese, os espermatozoides foram centrifugados a 200g por 5 minutos em PBS sem cálcio e magnésio. Ao sedimento foram adicionados 375µl de acetato de sódio (0,2M), 50 µl de dodecil sulfato de sódio-SDS (10%) e 5µl de proteinase K (20 mg/ml), agitados vigorosamente e incubados por 2 horas a 56°C. Após este período, 400µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) v:v:v foram adicionados, agitados e centrifugados por 2 minutos a 16.000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e colocado em tubo de 1,5ml. À camada aquosa foi adicionada 1,0 ml de isopropanol gelado, misturados por inversão do tubo e centrifugados por 2 minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi

então removido por inversão do tubo, sendo adicionados 500µl de álcool etílico 70% e centrifugado a 16.000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão do tubo e o sedimento seco em banho-maria a 56°C. Ao sedimento resultante foram adicionados 50µl de TE (Anexo E) aquecido (56°C), sendo incubado por 1 hora. Após a incubação, o material foi homogeneizado e quantificado em espectrofotômetro. As amostras foram diluídas na concentração final de 1ng/ml e armazenadas a -20°C.

13.5 DETECÇÃO DOS ÍNDICES DE TRANSFEÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Para quantificar os plasmídeos associados às células espermáticas foi efetuada a PCR quantitativa em tempo real (Real time PCR) no equipamento ABIPrism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstad, Alemanha) do Laboratório de Oncologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, utilizando o Platinum® SYBR® Green qPCR supermix – UDG com ROX (Invitrogen, Califórnia, EUA). Em cada reação de PCR foram adicionados 12,5µl de Platinum® SYBR® Green, 0,5µl de ROX, 5,6µl de H₂O ultrapura livre de DNase, 5µl de amostra e 0,7µl do primer senso e 0,7µl do anti-senso (500nM cada), descritos no quadro 2. O plasmídeo pEYFP-Nuc foi utilizado como amostra para análise da curva padrão na concentração de 25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0,0025ng. Para a amplificação foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 64°C por 1 minuto.

Os primers foram desenhados com o programa *Gene Runner*, baseado na sequência fornecida pelo fabricante. Diferenças na quantidade de plasmídeo, entre

os grupos de espermatozóides, foram avaliadas mediante a estimativa da eficiência de amplificação (CT) comparada e normalizada pela equação da reta obtida com a curva padrão dos plasmídeos.

pEYFP-Nuc	Senso	5' ATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 3'
	Anti-senso	5' TGCCGTCCTCGATGTTGTG 3'

Quadro 2 – Primers utilizados para a amplificação por PCR em tempo real do DNA exógeno associado às células espermáticas

13.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos foram analisados utilizando o programa estatístico MINITAB Realease 14 Statistical Software (Pennsylvania, EUA). Previamente os parâmetros observados foram verificados quanto à homogeneidade e à distribuição dos dados. Após atenderem estas premissas estatísticas, os dados foram submetidos à análise de variância. Os dados da citometria de fluxo foram comparados pelo teste Tukey e os da PCR em tempo real pelo teste Fisher's, ambos com nível de significância de 5%.

14 RESULTADOS

Quando os espermatozóides foram incubados com ou sem DNA exógeno por 60, 90 e 120 minutos, não foi observado efeito da adição de DNA exógeno nos índices de espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose e em necrose inicial ou apoptose tardia. O tempo de incubação também não causou alteração nos índices de espermatozóides vivos, em apoptose e em necrose. Entretanto, houve aumento no índice de espermatozóides em necrose inicial ou apoptose tardia, com DNA exógeno (de 16,9% para 33,3%) e sem (de 16,9% para 23,9%) com 60 minutos para 120 minutos de incubação (Tabela 4 e Figura 9). Isto significa que houve aumento na quantidade de espermatozóides que entraram em necrose antes da apoptose ter começado (necrose inicial) ou na quantidade de espermatozóides que iniciaram a apoptose após a necrose ter começado (apoptose tardia).

A equação da reta obtida com a amplificação do pEYFP-Nuc nas concentrações de 25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0,0025 (Tabela 5) apresentou eficiência de $R^2 = 0,9987$ (Gráfico 4 e Figura 10) onde R^2 igual a 1 significa 100% de eficiência.

A quantidade de DNA exógeno associado aos espermatozóides variou durante a incubação, sendo que 120 minutos de incubação foi o tempo no qual foi observado maior quantidade de DNA exógeno associado aos espermatozóides (0,0092ng). Aos 90 minutos de incubação foi observado 0,0054ng de DNA exógeno associado aos espermatozóides, enquanto que aos 60 minutos foi observado 0,0054ng (Tabela 6).

Figura 9 – Esquema representativo da viabilidade espermática determinada pelo Yo-pro e pelo iodeto de propídeo (IP) na citometria de fluxo. A) Células espermáticas incubadas por 60 minutos sem DNA exógeno. B) Células espermáticas incubadas por 90 minutos sem DNA exógeno. C) Células espermáticas incubadas por 120 minutos sem DNA exógeno. D) Células espermáticas incubadas por 60 minutos com DNA exógeno. E) Células espermáticas incubadas por 90 minutos com DNA exógeno. F) Células espermáticas incubadas por 120 minutos com DNA exógeno

Tabela 4 – Porcentagem de espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose ou necrose inicial/apoptose tardia avaliados no citômetro de fluxo, após diferentes tempos de incubação - São Paulo – 2006

Tempo Classe	60 minutos		90 minutos		120 minutos	
	S/DNA (%)	C/DNA (%)	S/DNA (%)	C/DNA (%)	S/DNA (%)	C/DNA (%)
Vivos	68,5±6,5	68,8±4,9	57,5±10,3	59,57±8,1	46,4±8,3	51,9±2
Apoptose	11,7±2	10,1±2,2	11,5±2,1	10,7±2,5	17,9±4,5	18,8±6
Necrose	2,9±1,7	4,1±1,4	3,5±1,4	4±0,7	2,5±1,7	5,3±3,2
Nei/Apt	16,9±2,9 ^b	16,9±2,9 ^b	27,5±7 ^{ba}	25,7±6 ^{ba}	33,3±3,9 ^a	23,9±7,2 ^a

Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05). Comparação entre colunas.

Nei/Apt: necrose inicial ou apoptose tardia

Tabela 5 – Curva de amplificação da diluição do pEYFP-Nuc - São Paulo – 2006

Concentração	Log da concentração	Média do CT
25	1,39794	9,3
2,5	0,39794	13,08
0,25	-0,60206	16,47
0,025	-1,60206	19,7
0,0025	-2,60206	22,81

Figura 10 – Padrão de amplificação da curva de diluição (A) e de dissociação (B) do plasmídeo pEYFP para obtenção da equação da reta

Gráfico 4 – Equação da reta obtida com a amplificação do plasmídeo nas diluições de 25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0,0025ng - São Paulo – 2006

Tabela 6 – Quantidade de plasmídeo associado a 5×10^6 espermatozóides nos diferentes tempos de incubação - São Paulo – 2006

Tempo	Quantidade
60	0,0066±0,0021 ^a
90	0,0054±0,0018 ^a
120	0,0092±0,0021 ^b

Letras diferentes representam diferença significativa para $p < 0,05$

Figura 11 – Amplificação do pEYFP dos espermatozóides incubados com o plasmídeo por 60, 90 e 120 minutos

15 DISCUSSÃO

O tempo de incubação dos espermatozóides parece ter importante papel na transferência gênica mediada por espermatozóide (TGME). Um maior tempo de incubação pode favorecer a interação dos espermatozóides com moléculas de DNA exógeno, aumentando os índices de células transfectadas. Em oposição, um grande número de moléculas de DNA exógeno internalizado pode ativar endonucleases, causando a degradação do DNA exógeno e do endógeno, promovendo um processo semelhante à apoptose (MAIONE et al., 1997). Além disto, o aumento no tempo de incubação reduz a viabilidade espermática o que pode provocar redução da eficiência da interação dos espermatozóides com moléculas de DNA exógeno e da fecundação.

No presente estudo foi avaliada a quantidade de DNA exógeno e a indução de apoptose e/ou necrose das células espermáticas incubadas por 60, 90 e 120 minutos. Ao avaliar a quantidade de DNA exógeno associado às células espermáticas, o tempo de 120 minutos apresentou maior quantidade de DNA exógeno associado às células espermáticas.

Lavitrano et al. (1989), ao incubarem espermatozóides de camundongo por 2 horas com moléculas de DNA exógeno marcadas radioativamente observaram que houve rápida associação do DNA exógeno até os 30 minutos, seguido por uma associação lenta e crescente até 2 horas de incubação. O mesmo resultado foi encontrado por Francolini et al. (1993), quando incubaram espermatozóide de camundongo por 2 horas.

Já Castro et al. (1990) incubando células espermáticas por 45 minutos com DNA marcado radioativamente, observaram variação entre espécies, havendo associação rápida aos 15 minutos em suínos, murinos e caprinos e de 30 minutos em bovinos e bubalinos. Após este período, a interação de DNA exógeno com os espermatozóides aumentou lentamente. Entretanto, Camaioni et al. (1992) ao incubarem espermatozóides de humanos, bovinos e suínos por 80 minutos observaram associação máxima do DNA exógeno aos 20 minutos de incubação em humanos e aos 40 minutos em bovinos e suínos, observando que um longo tempo de incubação causa perda de DNA exógeno associado aos espermatozóides.

Lavitrano et al. (2003) encontraram diferenças nos índices de ligação de DNA exógeno com espermatozóides suínos em diferentes animais, que variaram de 9% a 67% de associação. Entretanto, os diferentes animais apresentaram cinética de associação similar. Em todos os casos, a associação do DNA exógeno com as células espermáticas iniciou entre 15 e 30 minutos, seguida por uma fase platô aos 60 minutos.

Estes resultados geram duas hipóteses sobre a interação do DNA exógeno com as células espermáticas. A primeira é que a interação do DNA exógeno é contínua e dinâmica, quanto maior o tempo de incubação maior o número de moléculas de DNA exógeno associadas aos espermatozóides e que esta interação aumenta enquanto o espermatozóide é viável. A segunda é que existe saturação na interação do DNA exógeno, provavelmente devido ao número de receptores presentes na membrana dos quais a interação é dependente existindo uma saturação da interação em relação ao tempo de incubação.

Independente da cinética da interação do DNA exógeno com as células espermáticas, a pergunta que se faz é se os espermatozóides ligados a um maior

número de DNA exógeno conseguem internalizá-los na mesma proporção. Ou seja, se a ligação do DNA exógeno é contínua, a internalização também é? Ou, se a interação do DNA exógeno com as células espermáticas satura ao longo do tempo de incubação será que a internalização também satura? Assim, independente da interação dos espermatozóides ser crescente ou não, a pergunta é se o mecanismo de internalização do DNA exógeno se porta de maneira semelhante à interação?

Como os trabalhos que avaliaram a cinética da interação utilizaram radioautografia dos espermatozóides em microscopia óptica avaliando apenas a associação das moléculas de DNA marcados radioativamente, faz-se necessário avaliar também a quantidade de DNA exógeno internalizado nos espermatozóides. Estudos utilizando radioautografia convencional não fornecem informações detalhadas sobre a localização subcelular do DNA exógeno marcado radioativamente. Informação esta que pode ser de grande ajuda na avaliação do uso do espermatozóide como veículo para a introdução de DNA exógeno no oócito (CAMAIONI et al., 1992).

Para avaliar a internalização do DNA exógeno em células espermáticas, Camaioni et al. (1992) utilizando radioautografia em microscopia eletrônica de alta resolução observaram que as moléculas de DNA exógeno localizavam-se preferencialmente na parte caudal da cabeça do espermatozóide, na periferia da célula logo abaixo do citoplasma e em alguns espermatozóides estavam presentes também no núcleo (10%). Entretanto, avaliaram apenas a localização do DNA internalizado não avaliando a cinética da internalização do DNA exógeno.

Francolini et al. (1993) demonstraram que uma considerável quantidade de DNA exógeno interagiu com as células espermáticas, e que, parte dela foi rapidamente associada ao núcleo. A radioatividade no núcleo aumentou durante o

tempo de incubação indicando que a quantidade de DNA exógeno associado ao núcleo também foi crescente.

Os resultados deste presente trabalho junto com os de Francolini et al. (1993) corroboram para a hipótese de que a interação e a internalização são eventos contínuos e dinâmicos, onde um número crescente de DNA exógeno é associado aos espermatozóides e igualmente um número crescente de DNA exógeno é internalizado nas células espermáticas.

Com estes resultados surgiu uma dúvida. Maione et al. (1997) observaram que espermatozóides incubados com grande quantidade de DNA exógeno ativam uma resposta mediada por endonucleases. A atividade de nuclease endógena é dependente de cálcio, inibida pelo ácido aurintricarboxílico e ativada por cálcio ionóforo, por exemplo, respectivamente inibidor e ativador de apoptose (SCHWARTZMAN; CIDLOWSK, 1993). Além disso, quando endonucleases espermáticas são eficientemente ativadas durante a incubação com moléculas de DNA exógeno, catalisam a degradação do DNA do espermatozóide, direcionando eventualmente para a morte celular.

Em resumo, um maior tempo de incubação promove um aumento na interação e internalização de moléculas de DNA exógeno nas células espermáticas. Entretanto, não se sabe se este aumento na quantidade de DNA exógeno nas células espermáticas ativa as endonucleases promovendo um processo semelhante a apoptose (SPADAFORA, 1998).

Não foram observadas diferenças na quantidade de células espermáticas incubadas com ou sem DNA exógeno em apoptose, necrose, ou viáveis em nenhum tempo de incubação avaliados neste trabalho. Entretanto, houve efeito do tempo de incubação, no qual houve diferença no número de espermatozóide em necrose

inicial e/ou apoptose tardia (Nei/Apt) entre 60 e 120 minutos, tanto nos espermatozóides incubados com ou sem DNA exógeno. Ou seja, a necrose ocorreu antes da apoptose ter iniciado (necrose inicial) ou a apoptose ocorreu depois de necrose ter começado (apoptose tardia). Entretanto, esta indução da Nei/Apt não foi provocada pelo aumento na quantidade de DNA exógeno associada às células espermáticas, mas induzida pelo tempo de incubação, uma vez que o aumento da Nei/Apt também ocorreu nos espermatozóides incubados sem DNA exógeno.

Independente das células estarem em necrose inicial ou apoptose tardia, a apoptose e a necrose apresentam processos e características diferentes, contudo, nos dois eventos ocorre a degradação do DNA endógeno, sendo o primeiro mediado por endonucleases (HEWISH; BURGOYNE, 1973^{a,b}) e o segundo por desoxiribonucleases lisossomais (AFANAS'EV et al., 1986; DUVALL; WYLLIE, 1986).

Baseado nos resultados, um maior tempo de incubação das células espermáticas aumentou a quantidade de espermatozóides em Nei/Apt, provavelmente ativada pelas endonucleases e conseqüente degradação do DNA exógeno associado aos espermatozóides. Entretanto, este aumento na quantidade de espermatozóides em Nei/Apt, embora possa ter degradado o DNA exógeno, não foi suficiente para reduzir a eficiência da transfecção nos espermatozóides incubados por 120 minutos em relação aos espermatozóides incubados por 60 e 90 minutos. Assim 120 minutos foi o tempo de incubação que apresentou maior quantidade de DNA exógeno ligado e/ou internalizado nos espermatozóides.

16 CONCLUSÕES

Os resultados deste capítulo permitiram concluir que:

- 1) O número de moléculas associadas às células espermáticas não altera a quantidade de espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose ou em necrose inicial ou apoptose tardia. O tempo de incubação induz o aumento na quantidade de espermatozóides em necrose inicial e/ou apoptose tardia.
- 2) Um maior tempo de incubação propicia maior associação das moléculas de DNA exógeno com as células espermáticas.
- 3) O melhor índice de transfecção é obtido com duas horas de incubação.

CAPÍTULO 3

**Efeito do tamanho, da estrutura e da concentração do DNA
exógeno sobre os índices de transfecção e indução de
apoptose e de necrose de células espermáticas**

RESUMO

FEITOSA, W. B. Efeito do tamanho, da estrutura e da concentração da seqüência de DNA exógeno sobre os índices de transfecção e indução de apoptose e de necrose de células espermáticas - São Paulo – 2006.

Neste capítulo, o efeito do tamanho, da estrutura e da concentração do DNA exógeno sobre os índices de transfecção e a indução de apoptose e de necrose dos espermatozóides foram estudados. Para as seqüências de tamanhos diferentes, foram utilizadas seqüências de 2,2; 5,5 e 8,5kb nas concentrações de 500ng ou 5×10^{11} moléculas. Nas seqüências de diferentes estruturas, foram utilizadas seqüência rica em oligonucleotídeos AT, seqüência intermediária ou seqüência rica em GC. Na avaliação da indução de apoptose, os espermatozóides foram incubados com as diferentes seqüências, corados com as sondas fluorescentes Yo-pro e iodeto de propídio e avaliados em citômetro de fluxo. Para a avaliação dos índices de transfecção, o DNA exógeno foi quantificado por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que nenhuma seqüência induziu apoptose ou necrose. Quanto ao índice de transfecção, a quantidade de DNA exógeno não apresentou efeito. Entretanto, o tamanho e a estrutura da seqüência apresentaram efeito na associação do DNA exógeno com os espermatozóides, com melhor resultado para a seqüência de 5,5 kb tanto na concentração 500ng (0,0745) quanto na de 5×10^{11} (0,03383ng), e para a seqüência rica em AT (0,8165ng). Conclui-se que o tamanho e a estrutura do DNA exógeno influenciaram os índices de transfecção.

Palavras-chave: DNA exógeno. Transferência gênica. Espermatozóide. Transgenia

Weber Beringui Feitosa

17 INTRODUÇÃO

Estudos sobre a produção de animais transgênicos têm sido desenvolvidos intensivamente e com sucesso em camundongos e recentemente em ratos (CHARREAU et al., 1996). Todavia, a adaptação e a utilização destas técnicas em animais domésticos continuam problemáticas (WALL et al., 1997) apresentando baixa integração do transgene (EYESTONE, 1994). Em 1989, Lavitrano e colaboradores produziram camundongos transgênicos utilizando espermatozóides como vetores de DNA exógeno. Esta técnica tem sido estudada para a produção de animais geneticamente modificados. Contudo, ainda apresenta resultados inconstantes com eficiência de transfecção variando de 0 a 100 % (MAIONE et al., 1998). As explicações para esta variação apontam para vários fatores que possuem importante papel na TGME que ainda permanecem elusivos.

Lavitrano et al. (1992), ao incubarem espermatozóides de camundongo com moléculas de DNA exógeno de diferentes tamanhos observaram que moléculas de DNA maiores se ligam mais eficientemente às células espermáticas, sugerindo que a carga da molécula influencia nesta interação. De fato, a interação é iônica e moléculas carregadas negativamente parecem ser favorecidas na interação com os espermatozóides, já que uma dada quantidade de carga é necessária para uma completa ligação e/ou internalização. Quanto maior o tamanho da molécula, maior é a carga negativa e, teoricamente, maior é a interação com células espermáticas.

Outro fator que pode influenciar a eficiência da TGME é a quantidade de DNA exógeno incubado com espermatozóides. Camaione et al. (1997) observaram que

células espermáticas incubadas com altas doses de DNA exógeno promovem a degradação do DNA espermático.

A diferença do tamanho, da estrutura e da quantidade de DNA exógeno pode ser um dos fatores para explicar a variabilidade dos resultados encontrados na literatura. O entendimento destas variáveis poderá auxiliar na elaboração de protocolos de TGME específicos para cada tipo de DNA exógeno.

18 HIPÓTESE

O tamanho, a estrutura (%AC ou GC) e a quantidade de DNA exógeno influenciam os índices de transfecção das células espermáticas e ativam o metabolismo celular desencadeando o processo de apoptose.

19 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

19.1 GERAL

Estudar o efeito do DNA exógeno na transfecção e na indução da apoptose de células espermáticas.

19.2 ESPECÍFICOS

Avaliar no índice de transfecção de células espermáticas e na indução de apoptose:

1. O efeito do tamanho do DNA exógeno.
2. O efeito da concentração do DNA exógeno.
3. O efeito da estrutura do DNA exógeno.

20 MATERIAL E MÉTODO

Para realização deste trabalho, o material e a metodologia utilizada foram descritos a seguir:

20.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

20.2 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DIFERENTES TAMANHOS

Para avaliar o efeito do tamanho da sequência e da concentração de DNA exógeno na interação com as células espermáticas e na indução de apoptose e de necrose, foram utilizadas sequências de DNA exógeno de aproximadamente 2,2; 5,5 e 8,5 kb. A sequência de 2,2 kb (Figura 12) foi construída a partir do vetor pcDNA3.1/V5-His/ABC digerido com a enzima de restrição *Sal* I que corta na posição 3315 e 5501 do vetor, gerando dois fragmentos, sendo um de 3312 e um de 2190 pb e posteriormente purificada.

Nas sequências de 5,5 kb (Figura 13) e 8,5 (Figura 14), foram utilizados os vetores pcDNA3.1/V5-His/ABC e pcDNA3.1/V5-His/lacZ, respectivamente (Invitrogen, EUA). Os vetores foram linearizados com a enzima de restrição *Hind* III que corta na posição 977 do pcDNA3.1/V5-His/ABC e na posição 4028 do pcDNA3.1/V5-His/lacZ.

Figura 12 – Sequência de 2,2 kb - Vetor pcDNA 3.1/V5-His A digerido com a enzima de restrição *Sal* I

Figura 13 – Sequência de 5,5 kb - Vetor pcDNA 3.1/V5-His A linearizado com a enzima de restrição *Hind* III

Figura 14 – Sequência de 8,5 kb - Vetor pcDNA 3.1/V5-His/LacZ linearizado com a enzima de restrição *Hind* III

20.3 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DIFERENTES ESTRUTURAS

Para avaliação do efeito da estrutura do DNA exógeno na interação com células espermáticas, foram utilizadas três seqüências de DNA (Gráfico 6), sendo a primeira de 569pb com 65,7% de AT (seqüência AT), a segunda de 536pb com 46,4% de AT (seqüência intermediária - IN) e a terceira com 38,6% de AT (seqüência GC).

Para obtenção da seqüência AT (Figura 15) foi utilizado a seqüência da ankyrin like protein (ankB) obtida da *Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130* (Seqüência disponível no Gene bank. GeneID: 2771579 Locus tag: LIC12033¹), anteriormente clonada no vetor pGEM-T Easy. O pGEM-T Easy foi digerido com as enzimas de restrição *BamH* I e *Hind* III para a liberação do fragmento de 569pb.

A seqüência IN (Figura 16) foi obtida do pGEM-T Easy digerido com a enzima de restrição *Mnl* I que corta na posição 2896 e 416 do plasmídio, liberando um fragmento de 536pb.

Para obtenção da seqüência GC (Figura 17) foi utilizado fragmento de 440pb referente ao gene YFP (“Yellow Fluorescent Protein” - Clontech, USA), anteriormente clonado no vetor pGEM-T Easy. O vetor pGEM-T Easy foi digerido com as enzimas de restrição *Apa* I e *Sac* I liberando o produto de PCR contendo as extremidades do pGEM-T Easy (80pb), gerando um fragmento de 520pb.

Bactérias DH5 α foram transformadas com os plasmídeos descritos seguindo o protocolo descrito anteriormente no item 6.1.2 e a extração do DNA plasmidial realizado como descrito no item 6.1.3, ambos do Capítulo 1.

¹ Seqüência cedida pela Dr^a. Elizabeth Angélica Leme Martins do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan

Gráfico 6 - Porcentagem de nucleotídeos AT e GC nas diferentes seqüências

Figura 15 – Sequência AT – LIC 12033 clonada no vetor pGEM-T Easy digerido com as enzimas de restrição *BamH I* e *Hind III*

Figura 16 – Sequência IN – Vetor pGEM-T Easy digerido com a enzima de restrição *Mnl I*

Figura 17 – Sequência GC – Fragmento do pEYFP-Nuc clonado no vetor pGEM-T Easy digerido com as enzimas de restrição *Apa I* e *Sal I*

20.4 FLUXOGRAMA DA CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA EXÓGENO

20.4.1 Sequências de diferentes tamanhos

20.4.2 Sequências de diferentes estruturas

20.5 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

20.5.1 Digestão do DNA plasmidial

Para digestão dos plasmídeos, a cada 10µl de reação foram adicionados 3,5µl de DNA, 5,0µl de água, 1,0µl dos respectivos tampões e 0,5µl de enzima. A solução de digestão foi incubada em estufa a 37°C, por 2 horas. As enzimas e tampões utilizados nas digestões das seqüências estão descritos no quadro 3. O vetores pcDNA3.1/V5-His/lacZ e pcDNA3.1/V5-His/ABC foram apenas linearizados enquanto que os vetores pcDNA3.1/V5-His/ABC, pGEM-T Easy-AT, pGEM-T Easy-IN e pGEM-T Easy-GC foram digeridos em dois pontos para a liberação do fragmento de interesse

Vetores	Enzima que digeriu no 1° sítio de digestão	Enzima que digeriu no 2° Sítio de digestão
pcDNA3.1/V5-His/lacZ	<i>Hind</i> III	—
pcDNA3.1/V5-His/ABC	<i>Hind</i> III	—
pcDNA3.1/V5-His/ABC	<i>Sal</i> I	<i>Sal</i> I
pGEM-T Easy-AT	<i>EcoR</i> I	PvuI
pGEM-T Easy-IN	<i>MnI</i> I	<i>MnI</i> I
pGEM-T Easy-GC	<i>Apa</i> I	SacI

Quadro 3 – Enzimas de restrição utilizadas na digestão dos diferentes vetores

20.5.2 Purificação do DNA

Os plasmídios que foram digeridos em dois pontos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Anexo E) por 1 hora a 80V corado com brometo de Etídio (Anexo E). O gel foi visualizado sobre luz ultravioleta. A banda referente ao fragmento de interesse foi recortada do gel e purificada utilizando o Concert Rapid Gel Extraction System (Gibco, BRL), seguindo instruções do fabricante. A banda recortada foi colocada em um tubo de microcentrífuga de 2ml. Para cada 10mg de agarose contendo a banda de interesse foram adicionados 30µl de solução 1 e incubados a 50°C.

O conteúdo do tubo foi homogeneizado a cada 3 minutos até a dissolução da agarose, sendo então incubado por mais 5 minutos. Após a incubação, a solução foi transferida para uma coluna com filtro de purificação em um tubo de microcentrífuga e centrifugada à 16.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e 700µl de solução L2 gelada foram adicionados à coluna, sendo incubada por 5 minutos. A solução foi centrifugada 2 vezes a 16.000 g por 1 minuto e os filtrados descartados. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 50µl de TE aquecido a 65°C e centrifugado por 2 minutos a 16.000 g. O filtrado contendo o DNA purificado do gel foi armazenado a -20°C.

20.6 INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES COM O DNA

Os espermatozóides foram preparados conforme descrito no item 6.2 do Capítulo 1, e incubados na concentração de 5×10^6 espermatozóides/ml por 1 hora sem DNA exógeno (controle) ou com as seqüências 2,2; 5,5 ou 8,5 em ng ou em números de moléculas (Tabela 7) ou com 500ng/ml das seqüências AT; IN ou GC.

Tabela 7 – Relação entre a massa e o número de moléculas das seqüências de DNA de diferentes tamanhos

Seqüência	Ng (N° moléculas)	N° moléculas (ng)
2,2kb	500 ($19,2 \times 10^{11}$)	5×10^{11} (130)
5,5kb	500 ($7,7 \times 10^{11}$)	5×10^{11} (323)
8,5kb	500 (5×10^{11})	5×10^{11} (500)

20.7 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE E/OU NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após as incubações dos espermatozóides com as diferentes seqüências de DNA exógeno, a indução de apoptose e de necrose dos espermatozóides foi avaliada conforme descrito no item 13.3 do Capítulo 2.

20.8 EXTRAÇÃO DO DNA DOS ESPERMATOZÓIDES

Após as incubações com as diferentes seqüências de DNA exógeno, o DNA dos espermatozóides foi extraído como descrito no item 13.4 do Capítulo 2

20.9 DETECÇÃO DOS ÍNDICES DE TRANSFEÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Para quantificar as seqüências associadas às células espermáticas foi efetuado a PCR quantitativa em tempo real (Real time PCR) nas mesmas condições descritas no item 13.5 do Capítulo 2, utilizando os primers descritos no quadro 6. O plasmídio pcDNA3.1/V5-His/LacZ e as seqüências 8,5, AT, IN e GC foram utilizadas para confecção da curva padrão na concentração de 25; 2,5; 0,25; 0,025 e 0,0025ng.

Todos os primers foram construídos com o programa *Gene Runner* baseado na seqüência fornecida pelo fabricante (pCDNA, pEYFP-Nuc e pGEM-T-Easy) ou na seqüência depositada no Gene bank (LIC). Os pares de primers das seqüências 2,2; 5,5 e 8,5 foram construídos (Quadro 4) baseados na seqüência do gene de resistência à ampicilina dos plasmídios, de maneira que o mesmo par de primers amplificasse as seqüências de diferentes tamanhos.

Diferenças na quantidade de DNA exógeno associado às células espermáticas entre os diferentes grupos, foram avaliadas mediante a estimativa da eficiência de amplificação e a variação na quantidade das seqüências (curva de amplificação (CT)) foram normalizados pela equação da reta obtida pela curva padrão.

Seqüências 2.2; 5.5 e 8.5	Senso	5' ACGGGAGGGCTTACCATCTG 3'
	Anti-senso	5' TGATAAATCTGGAGCCGGTGAG 3'
Seqüência AT	Senso	5' GCTGCTTATAACGGGTGGGAG 3'
	Anti-senso	5' ACATCCGCACCCTGAGAAATC 3'
Seqüência IN	Senso	5' CAGTCGGGAAACCTGTAGTG 3'
	Anti-senso	5' AATACGCAAACCGCCTCTCC 3'
Seqüência GC	Senso	5' ATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 3'
	Anti-senso	5' TGCCGTCCTCGATGTTGTG 3'

Quadro 4 – Primers utilizados para a amplificação por PCR em tempo real do DNA exógeno.

20.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos experimentos foram analisados utilizando o programa estatístico MINITAB Realease 14 Statistical Software (Pennsylvania, EUA). Previamente os dados foram verificados quanto à homogeneidade e à distribuição das variáveis, sendo transformados na base log caso não apresentassem distribuição homogênea. Após atenderem as premissas estatísticas os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste Tukey com nível de significância de 5%.

21 RESULTADOS

Não foi observado efeito do tamanho, da concentração (Tabela 7 e Figura 18) e da estrutura (Tabela 8 e Figura 19) do DNA exógeno sobre os índices de espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose e em necrose inicial ou apoptose tardia.

A equação da reta obtida com a amplificação do pEYFP-Nuc, pCDNA, pGEM-T easy e a seqüência LIC nas concentrações de 25, 2,5, 0,25, 0,025 e 0,0025 apresentaram, respectivamente, eficiência de $R^2 = 0,9971$, $R^2 = 0,9942$, $R^2 = 0,9998$ e $R^2 = 0,9988$, onde R^2 igual a 1 significa 100% de eficiência (Figura 20 e 21).

Quando 5×10^6 espermatozóides foram incubados com 500ng das seqüências de diferentes tamanhos (Figura 22), a seqüência que mais se associou às células espermáticas foi a de 5,5kb (0,0745ng, Tabela 9). Quando 5×10^6 espermatozóides foram incubados com 5×10^{11} moléculas das seqüências de diferentes tamanhos (Figura 23) a seqüência de 2,2kb e 5,5kb foram as que mais se associaram aos espermatozóides apresentando, respectivamente, 0,02883 e 0,03383ng de seqüências associadas (Tabela 10).

Quando foi avaliado o efeito de diferentes estruturas de DNA exógeno na associação com os espermatozóides (Figura 24), a seqüência que mais se associou foi a rica em AT com 0,8165ng de DNA associado aos espermatozóides (Tabela 11).

Tabela 7 – Porcentagem dos espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose ou em necrose inicial ou apoptose tardia avaliados no citômetro de fluxo após incubação com seqüências de DNA exógeno de diferentes tamanhos ou quantidades - São Paulo – 2006

Classificação	Controle	Seqüência 2.2 (500ng)	Seqüência 2.2(5x10¹¹)	Seqüência 5.5 (500ng)	Seqüência 5.5 (5x10¹¹)	Seqüência 8.5(500ng)	Seqüência 8.5(5x10¹¹)
Vivos	54,8±6,0	56,8±9,8	64,5±2,4	63,2±5,5	53±6,1	56±3,4	53,4±7,0
Apoptose	11,3±1,5	10,7±2,2	10,1±1,6	9,3±3,0	13,8±8,6	11,4±3,6	14,5±7,7
Necrose	0,8±7,6	0,5±0,1	0,4±0,2	1,8±2,4	1±1,0	0,64±0,8	0,9±0,7
Nei/Apt	32,9±5,0	32±7,5	24,9±0,7	25±6,0	32,1±1,8	31,9±5,5	31,1±1,7

Letras diferentes representam diferença significativa para p<0,05

Nei/Apt: espermatozóides em necrose inicial ou apoptose tardia

Figura 18 – Permeabilidade seletiva das células espermáticas em apoptose ao Yo-pro e em necrose ao IP avaliadas pelo citômetro de fluxo. A) Células espermáticas incubadas sem a adição de DNA exógeno. B) Células espermáticas incubadas com 500ng da sequência 2,2. C) Células espermáticas incubadas com 500ng da sequência 5,5. D) Células espermáticas incubadas 500ng (5×10^{11} moléculas) da sequência 8,5. E) Células espermáticas incubadas 5×10^{11} moléculas da sequência 2,2 (130ng). F) Células espermáticas incubadas 5×10^{11} moléculas da sequência 5,5 (323ng). G) Células espermáticas incubadas 5×10^{11} moléculas da sequência 8,5 (500ng)

Figura 19 – Permeabilidade seletiva das células espermáticas em apoptose ao Yo-pro e em necrose ao IP avaliadas pelo citômetro de fluxo. Células espermáticas incubadas sem DNA exógeno (A), com a adição da sequência AT (B), sequência IN (C) e sequência GC (D)

Tabela 8 – Índice de espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose ou em necrose inicial ou apoptose tardia avaliados no citômetro de fluxo após incubação com sequências de DNA exógeno de diferentes estruturas - São Paulo – 2006

Classificação	Controle	Sequência AT	Sequência IN	Sequência GC
Vivos	64,8±5,2	57,9±7,7	53,1±5,5	54,6±2,4
Apoptose	8,4±1,4	9,5±2,7	9,6±4,1	10,8±1,1
Necrose	5,3±4,6	3,7±2	7,8±4,3	4,2±2,6
Nei/Apt	21,5±2,3	28,9±6,8	29,4±5,4	30,3±4,4

Nei/Apt: espermatozóides em necrose inicial ou apoptose tardia. Letras diferentes representam diferença significativa.

Figura 20 – Curva de amplificação das diluições das diferentes seqüências para formação da equação da reta com suas respectivas curvas de dissociação - São Paulo – 2006

Figura 21 – Equação da reta obtida com a amplificação da curva de diluição dos diferentes plasmídeos - São Paulo – 2006

Tabela 9 – Quantidade de DNA exógeno associado aos espermatozóides quando as seqüências de diferentes tamanhos foram incubadas em ng com as células espermáticas - São Paulo – 2006

Seqüência	2,2kb	5,5kb	8,5kb
Quantidade (ng)	0,02917±0,0115 ^a	0,07450±0,0317 ^b	0,00717±0,0039 ^a

Letras diferentes representam diferença significativa entre linhas ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Quantidade de DNA exógeno associado aos espermatozóides quando as seqüências de diferentes tamanhos foram incubadas em número de moléculas (5×10^{11}) com as células espermáticas - São Paulo – 2006

Seqüência	2,2kb	5,5kb	8,5kb
Quantidade (ng)	0,02883±0,0213 ^a	0,03383±0,0271 ^a	0,00250±0,0005 ^b

Letras diferentes representam diferença significativa entre linhas ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Quantidade de DNA exógeno de diferentes estruturas associado a 5×10^6 espermatozóides - São Paulo – 2006

Seqüência	AT	IN	GC
Quantidade (ng)	0,8165±0,6828 ^a	0,0788±0,0745 ^b	0,1965±0,1361 ^b

Letras diferentes representam diferença significativa para $p < 0,05$.

22 DISCUSSÃO

A ligação do DNA exógeno com as células espermáticas é mediada por uma classe de proteínas de 30-35kDa localizadas na cabeça dos espermatozóides que atuam como substrato para a ligação das moléculas de DNA exógeno formando um complexo estável na região subacrossomal dos espermatozóides de diferentes espécies (ATIKINSON et al., 1991; CAMAIONI et al., 1992; LAVITRANO et al., 1992; ZANI et al., 1995). Segundo Lavitrano et al. (1992), a interação do DNA exógeno com as células espermáticas é iônica, reversível, independente da sequência e que a carga das moléculas tem função importante na interação do DNA exógeno com células espermáticas. De fato, moléculas carregadas negativamente parecem ser favorecidas molecularmente em suas interações específicas, já que uma dada quantidade de carga é necessária para uma completa ligação e ou internalização. Não sendo restrita ao DNA exógeno, mas podendo ser reproduzida usando outras moléculas carregadas negativamente.

Assim, quanto maior a sequência de DNA exógeno, maior a carga negativa da molécula e, conseqüentemente, maior a interação do DNA exógeno com as células espermáticas. Entretanto, quando 500ng das seqüências de 2,2; 5,5 ou 8,5 kb foram incubadas com os espermatozóides a seqüência que apresentou maior interação com as células espermáticas foi a de 5,5 kb e a seqüência de 8,5 kb não diferiu da seqüência de 2,2kb.

Estes resultados entram em confronto com os resultados de Lavitrano et al. (1992), que ao utilizarem fragmentos de DNA exógeno de diferentes tamanhos, observaram que moléculas de DNA maiores (7000pb) se ligam mais eficientemente

às células espermáticas quando comparado às moléculas menores (150-750 bp). O fragmento de tamanho médio (1600bp) se ligou numa taxa intermediária. Já Horan et al. (1991) não observaram efeito do tamanho do transgene na ligação com células espermáticas de suínos no qual moléculas de 0,5 a 2,3 kb se ligaram de maneira semelhante.

Os trabalhos que avaliaram o efeito do tamanho da seqüência de DNA exógeno na TGME avaliaram apenas a ligação com os espermatozóides, enquanto que neste presente trabalho, foi avaliada a quantidade total de DNA exógeno associados aos espermatozóides, incluindo o DNA exógeno ligado e internalizado no citoplasma e no núcleo dos espermatozóides. Desta forma, embora o tamanho da seqüência de DNA exógeno tenha papel fundamental na ligação com os espermatozóides, onde seqüências maiores apresentam vantagens em relação às menores, estes resultados sugerem que o tamanho da seqüência também apresenta efeito na internalização, o que ainda não havia sido descrito, onde seqüências muito grandes apresentam desvantagens em relação às intermediárias.

Um pergunta que surgiu em relação a estes resultados foi referente à quantidade de DNA exógeno incubado com os espermatozóides. Por terem tamanhos diferentes, os pesos em ng das diferentes seqüências representam quantidades diferentes de moléculas. Assim os resultados podem ser influenciados pelo fato das seqüências menores terem maior número de moléculas do que as seqüências maiores quando se encontram na mesma massa.

Os trabalhos que avaliaram o efeito do tamanho da molécula na ligação com espermatozóide trabalharam com a mesma massa nas diferentes seqüências. No trabalho em que Lavitrano et al. (1992) avaliaram o tamanho das seqüências foi utilizado 100ng de DNA exógeno independente do tamanho da seqüência e Horan et

al. (1991) utilizaram 1µg de cada seqüência que variaram de 0,125 até 23kb. Embora a diferença no número de moléculas possa ter interferido nos resultados da ligação do DNA exógeno com os espermatozóides no trabalho de Lavitrano et al. (1992), 100ng da maior seqüência de DNA exógeno e, conseqüentemente, com menor número de moléculas foi o que mais se ligou aos espermatozóides. Entretanto, se os espermatozóides tivessem sido incubados com o mesmo número de moléculas nas diferentes seqüências, a diferença na quantidade de moléculas associada aos espermatozóides poderia ter sido maior. Da mesma forma se Horan et al. (1991) tivesse incubado os espermatozóides com o mesmo número de moléculas, talvez pudesse haver diferença na quantidade de DNA exógeno associado aos espermatozóides, quando incubados com as seqüências de tamanhos diferentes.

Para evitar o favorecimento das seqüências menores em relação ao número de moléculas, as células espermáticas foram incubadas neste trabalho, com as seqüências de 2,2; 5,5 e 8,5 kb na concentração de 5×10^{11} . Nesta concentração, a quantidade em ng da seqüência de 8,5 kb associada aos espermatozóides passou a diferir da seqüência de 2,2kb, apresentando menor quantidade associada aos espermatozóides do que a seqüência 2,2kb a seqüência de 5,5kb. Sendo que desta vez a quantidade da seqüência de 5,5 kb não diferiu da seqüência de 2,2 kb (Tabela 10).

Estes resultados geram três hipóteses sobre a internalização do DNA exógeno nas células espermáticas.

Na primeira hipótese, embora moléculas maiores apresentam maior afinidade na ligação com os espermatozóides se ligando em maior quantidade que as moléculas menores, o mecanismo de internalização do DNA exógeno pode

apresentar dificuldade de internalizar grandes moléculas de DNA exógeno. Assim moléculas menores seriam internalizadas mais facilmente e em maior quantidade, diminuindo a vantagem que as moléculas maiores levam na ligação com os espermatozóides. Deste modo, moléculas de tamanho intermediário (5,5kb) levaram vantagem na ligação com os espermatozóides em relação às moléculas menores (2,2kb) e na internalização em relação às moléculas maiores (8,5kb), apresentando maior quantidade de DNA exógeno associada às células espermáticas.

Na segunda hipótese as moléculas maiores levariam vantagem sobre as moléculas menores tanto na ligação quanto na internalização nos espermatozóides, apresentando maior quantidade de DNA exógeno ligado e internalizado nos espermatozóides, entretanto a grande quantidade de DNA exógeno dentro de espermatozóide ativaria as endonucleases que degradaria o DNA endógeno e exógeno resultando num processo semelhante à apoptose.

A terceira hipótese seria que independente da quantidade internalizada, uma seqüência muito grande seria detectada mais facilmente do que seqüências menores, ativando as endonucleases resultando num processo semelhante ao que ocorre quando grande quantidade de DNA exógeno é internalizada.

Quando as células espermáticas são incubadas com grande quantidade de DNA exógeno ocorre a ativação das endonucleases que o degradam (MAIONE et al., 1997). Quando as endonucleases são eficientemente ativadas, também catalisam a degradação do DNA cromossomal do espermatozóide, eventualmente direcionando para a morte celular, num processo semelhante à apoptose.

Na tentativa de elucidar esta questão, foi avaliada a apoptose e necrose dos espermatozóides incubados com as diferentes seqüências de DNA exógeno. Entretanto, não foi observado diferença na quantidade de espermatozóides vivos,

em apoptose, em necrose e em necrose inicial ou apoptose tardia quando foram incubados com as seqüências de diferentes tamanhos e nas diferentes concentrações.

A presença de clivagem internucleossomal em células apoptóticas sugere que pode existir um mecanismo comum no qual a apoptose ocorre em diferentes tipos celulares, e também que a fragmentação do DNA é uma parte importante do processo de morte celular ocorrendo muito inicialmente no processo de apoptose (MARTIN et al., 1990; ODAKA et al., 1990), aparecendo várias horas antes da viabilidade celular começar a diminuir. A clivagem internucleossomal da cromatina é provocada pela atividade da endonucleases (GIANNAKIS et al., 1991), que não é somente uma enzima, mas uma família de isoenzimas relacionadas, que são responsáveis pela fragmentação da cromatina em apoptose em todos os tipos celulares. Quando a apoptose é induzida em células, a degradação do DNA é o primeiro evento detectado, 2 horas após a indução, entretanto, a diminuição da viabilidade celular não é iniciado até 8 horas após a indução da apoptose (SCHWARTZMA; CIDLOWSKI, 1993).

Desta maneira, o fato de não ter sido detectado apoptose nos espermatozóides quando incubados com as seqüências de diferentes tamanhos não significa que a seqüência de 8,5 kb não possa ter induzido a atividade de endonucleases que degradaria o DNA exógeno e o endógeno levando à apoptose. Mas que o teste utilizado não foi o mais apropriado, uma vez que é baseado nas alterações da permeabilidade de membrana que ocorre em células apoptóticas muito tempo após a endonucleases ter sido ativada e ter começado a degradar o DNA e a seqüência de DNA exógeno.

De qualquer maneira, o fato da maior seqüência ter apresentado resultado semelhante da menor seqüência traz uma importante informação para a TGME. Atualmente é aceito que a carga da seqüência influencia na interação do DNA exógeno com as células espermáticas onde moléculas maiores e conseqüentemente mais carregadas negativamente apresentam vantagem na ligação com os espermatozóides. Entretanto, até o presente trabalho, não se sabia os efeitos do tamanho da seqüência na internalização do DNA exógeno pelas células espermáticas. Este trabalho é o primeiro a relatar que moléculas maiores levam desvantagem na internalização em relação às moléculas menores.

Outra pergunta que tentou ser respondida foi se a estrutura de seqüência do DNA exógeno apresenta efeito na interação com células espermáticas. Segundo Sperandio et al. (1996), diferenças nos resultados não são justificadas somente pelo tamanho do DNA, pois a estrutura deste pode ter papel relevante no processo de TGME. Baseado nisto, foi verificado se a porcentagem dos oligonucleotídeos na seqüência de DNA exógeno influenciaria na associação com os espermatozóides.

Ao incubar os espermatozóides com seqüências de DNA exógeno rica em oligonucleotídeos AT (AT), intermediária (IN) ou rica em GC (GC), foi observado que a seqüência AT apresentou maior associação com os espermatozóides quando comparada com as seqüências IN e GC. Estes resultados confirmam a teoria proposta por Sperandio et al. (1996), na qual a estrutura da seqüência influencia na associação com células espermáticas, uma vez que as seqüências com estruturas diferentes apresentaram diferentes quantidades associadas aos espermatozóides. Mas não confirmaram a hipótese proposta de que as porcentagens dos oligonucleotídeos na seqüência poderiam influenciar na interação com os

espermatozóides, visto que as seqüências intermediárias não se associaram numa quantidade intermediária aos espermatozóides, não diferindo da seqüência GC.

Também não foi observado diferença na quantidade de células viáveis, em apoptose, em necrose e em necrose inicial ou apoptose tardia quando incubadas com as seqüências de diferentes estruturas. Não se sabe se a diferença na quantidade das seqüências de diferentes estruturas associadas aos espermatozóides foi devido a uma maior ligação da seqüência AT com as células espermáticas ou maior internalização ou se houve maior ativação das endonucleases quando a incubação foi feita com as seqüências IN e GC.

23 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que:

- 1) O tamanho da seqüência influencia a associação do DNA exógeno com as células espermáticas, sendo que as seqüências de 2,2 e de 8,5kb apresentam desvantagem na associação com os espermatozóides em relação à seqüência de 5,5kb.
- 2) A quantidade de DNA exógeno, tanto em ng quanto em número de moléculas, não altera a menor associação da seqüência de 8,5kb com os espermatozóides.
- 3) A estrutura da seqüência do DNA exógeno influencia na associação com os espermatozóides, entretanto esta influência não foi provocada pela quantidade dos nucleotídeos AT ou GC na seqüência.
- 4) O tamanho, a concentração e a estrutura das seqüências não alteram a quantidade de espermatozóides vivos, em apoptose, em necrose e em necrose inicial ou apoptose tardia.

REFERÊNCIAS¹

AFANAS'EV, V. N.; KOROL, B. A.; MATISYGIN, Y. A.; NELIPOVICH, P. A.; PECHATNIKOV, V. A.; UMANSKY, S. R. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. **FEBS Letters**, v. 194, p. 347-350, 1986.

ANGULO, C.; RAUCH, M. C.; DROPELMANN, A.; REYES, A. M.; SLEBE, J. C.; DELGADO-LOPEZ F. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and Vitamin C. **Journal of cellular biochemistry**, v. 71, p. 189-203, 1998.

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

AREZZO, F. Sea-urchin sperm as a vector of foreign genetic information. **Cell biology International Reports**, v. 13, p 391-404, 1989.

ATKINSON, P. W.; HINES, E. R.; BEATON, S.; MATTHAEI, K. I.; REED, K. C.; BRADLEY, M. P. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, p 1-5, 1991.

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

BIELFELD, P.; FAREDI, A.; ZANEVELD, L. J. D.; DEJOMGE, C. J. The zone pellucida-induced acrossome reaction of non-capacitated human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 61, p. 536-41, 1994.

BRACKETT, B. G.; BARANSKA, W.; SAWICKI, W. 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, p. 353-357, 1971.

¹ Conforme as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. atual. e ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

BRADLEY, M. P.; GEELAN, A.; LEITCH, V.; GOLDBERG, E. Cloning, sequencing, and characterization of LDH-C4 from a fox testis cDNA library. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 452-459, 1996.

BRINSTER, R. L.; CHEN, H. Y.; TRUMBAUER, M. E.; AVARBOCK, M. R. Translation of globin messenger RNA by the mouse ovum. **Nature**, v. 282, p. 499-501, 1980.

BUNCH, D. O.; WELCH, J. E.; MAGYAR, P. L.; EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 834-841, 1998.

BURANT, C. F.; DAVIDSON, N. O. GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. The **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 1488-1495, 1994.

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, p. 203-212, 1992.

CARBALLADA, R.; ESPONDA, P. Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 262, p.104-113, 2001.

CASTRO, F. O.; HERNANDEZ, O.; ULIVER, C.; SOLANO, R.; MILANÉS, C.; AGUILAR, A.; PÉREZ, A.; DE ARMAS, R.; HERRWERA, L.; DE LA FUENTE, J. Introduction of foreign DNA into the spermatozoa of farm animals. **Theriogenology**, v. 34, p 1099-1110, 1990.

CELEBI, C.; GUILLAUMEUX, T.; AUVRAY, P.; VALLET-ERDTMANN, V.; JÉGOU, B. The making of "transgenic spermatozoa". **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1477-1483, 2003.

CHANG, K.; QIAN, J.; JIANG, M.; LIU, Y.H.; WU, M. C.; CHEN, C. D.; LAI, C. K.; LO, H. L.; HSIAO, C. T.; BROWN, L.; BOLEN, J. JR.; HUANG, H. I.; HO, P. Y.; SHIH, P. Y.; YAO, C. W.; LIN, W. J.; CHEN, C. H.; WU F. Y.; LIN, Y. J.; XU J.; WANG, K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. **BMC Biotechnonology**, v. 2, p. 1-13, 2002.

CHARREAU, B.; TESSON, L.; SOULILLOU, J. P.; POURCEL, C.; ANEGON, I. Transgenesis in rats: technical aspects and models. **Transgenic Research**, v. 5 p. 223-34, 1996.

DUVALL, E.; WYLLIE, A. H. Death and the cell. **Immunology Today**, v. 7, p. 115-119, 1986.

ELLIS, J.; BERNSTEIN, A. Gene targeting with retroviral vectors - recombination by gene conversion into regions of nonhomology. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 4, p. 1621-27, 1989.

ERICSON, S. A.; GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; DOWNING, T. W.; MARSHALL, C. E. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009-1024, 1993.

EYESTONE, W. H. Challenges and progress in the production of transgenic cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 6, p. 647-652, 1994.

EYESTONE, W. H. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology, **Theriogenology**, v. 51, p. 509-517, 1999.

FRANCOLINI, M.; LAVITRANO, M.; LAMIA, C. L.; FRENCH, D.; FRATI, L.; COTELLI, F.; SPADAFORA, C. Evidence for nuclear internalization of exogenous dna into mammalian sperm cells. **Molecular Reproduction Development**, v. 34, p. 133-139, 1993.

GAGNE, M. B.; POTHIER, F.; SIRARD, M. A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v. 29, p 6-15, 1991.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses, **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GIANNAKIS, C.; FORBES, I. J.; ZALEWISKI, P. D. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent nuclease: tissue distribution, relationship to inter-nucleosomal DNA fragmentation and inhibition by Zn^{2+} . **Biochemical and biophysical research communications**, v. 181, p. 915-920, 1991.

- GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A.; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A.; RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p 7380-7384, 1980.
- HABROVA, V.; TAKAC, M.; NAVRATIL, J.; MACHA, J.; CESKOVA, N.; JONAK, J. Association of Rous sarcoma virus DNA with *Xenopus laevis* spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 332–342, 1996.
- HARRISON, R. A.; ASHWORTH, P. J.; MILLER, N. G. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes, **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378–391, 1996.
- HEWISH, D. R.; BURGOYNE, L. A. Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 52, p. 504-510, 1973^a.
- HEWISH, D. R.; BURGOYNE, L. A. The calcium dependent endonuclease activity of isolated nuclear preparations. Relationships between its occurrence and the occurrence of other classes of enzymes found in nuclear preparations. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 52, p. 475-481, 1973^b.
- HOGAN, B.; COSTANTINI, F.; LACY, E. Introduction of new genetic information. In: **HOGAN, B.; CONTANTINE, F.; LACY, E.** Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press Nova York; 1994, p. 153-203
- HOLT, C.; HOLT, W. V.; MOORE, H. D.; REED, H. B.; CURNOCK, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 312-323, 1997.
- HONDA, A.; SIRUNTAWINETI, J.; BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions, **Human Reproduction Update**, v. 8, p. 405-412, 2002.
- HORAN, R.; POWELL, R.; MCQUAID, S.; GANNON, F.; HOUGHTON, J. A. Association of foreign dna with porcine spermatozoa. **Archives of Andrology**, v. 26, p. 83-92, 1991.

HU, W. S.; PATHAK, V. K. Designe of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 493-511, 2000.

JACENKO, O. Strategies in generating transgenic mammals. **Methods in Molecular Biology**, v. 62, p. 399-424, 1997.

JAHNER, D.; JAENISCH, R. Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. **Nature**, v. 315, p. 594-97, 1985.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BOCKUS, B. J.; CHEN, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 88, p. 526-535, 1981

KHOO, H. W.; ANG, L. H.; LIM, H. B.; WONG, K. Y. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. **Aquaculture**, v. 107, p. 1-19, 1992.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 299-303, 1993.

KUZNETSOV, A. V.; KUZNETSOVA, I. V. Binding of exogenous DNA pRK3lacZ by the rabbit spermatozoa, its transfer in the oocytes and expression in the preimplantation embryos, **Ontogenez**, v. 26, p. 300-309, 1995.

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, p. 717-723, 1989.

LAVITRANO, M.; FORNI, M.; BACCI, M. L.; DI STEFANO, C.; VARZI, V.; WANG, H.; SEREN, E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. **Molecular Reproduction and Development**, 64, p.284-291, 2003.

LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; ZANI, M.; FRATI, L.; SPADAFORA, C. The Interaction between exogenous DNA and sperm cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 161-169, 1992.

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, p. 56-62, 1997.

MAIONE, B.; LAVITRANO, M.; SPADAFORA, C.; KIESSLING, A. A. Sperm-mediated gene transfer in mice. **Molecular Reproduction Development**, v. 50, 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 Cell Biology**, v. 16, p. 1087-1097, 1997.

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, p. 187-196, 1998.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W. N.; BOROS, L. G.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization, **FEBS Letter**, v. 554, p. 342-346, 2003.

MARTIN, S. J.; BONHAM, A. M.; COTTER, T. G. The involvement of RNA and protein synthesis in programmed cell death (apoptosis) in human leukaemia HL-60 cells. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, p. 634-636, 1990.

MARTINS, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces na apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 28-37, 2004.

MARTINS, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. **Human Reproduction**, v. 20, p. 3459-3468, 2005.

MCCREATH, K. J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K. H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v. 405, p.1066-1069, 2000.

MCLAUGHLIN, E. A.; FORD, W. C.; HULL, M. G. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 527–534, 1992.

MILLER, D. G.; ADAM, M. A.; MILLER, A. D. Gene-transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 8, p. 4239-4242, 1990.

MORI, C.; NAKAMURA, N.; WELCH, J. E.; GOTOH, H.; GOULDING, E. H.; FUJIOKA, M.; EDDY, E. M. Mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1-S protein is localized mainly in the sperm tail. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 374-385, 1998.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71 p. 540-547, 2004.

MUELLER, F.; IVIES, Z.; ERDELYI, F.; PAPP, T.; VARADI, L.; HORVATH, L.; MACLEAN, N. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, p. 276–281, 1992.

MULLINS, L. J.; MULLINS, J. J. Transgenesis in the rat and larger mammals. **The Journal of clinical Investigation**, v. 97 p. 1557-1560, 1996.

NAKANISHI, A.; IRITANI, A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods, **Molecular Reproduction Development**, v. 36, p. 258–261, 1993.

NIEMANN, H.; HALTER, R.; CARNWATH, J. W.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; PAUL, D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. **Transgenic Research**, v. 8, n. 3, p. 237–247, 1999.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic livestock, premises and promises. **Animal Reproductin Science**, v. 60, p. 277-293, 2000.

ODAKA, C.; KIZAKI, H.; TADAKUMA, T. cell receptor-mediated DNA fragmentation and cell death in T cell hybridomas. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 2096-2101, 1990.

- PATIL, J. G.; KHOO, H. W. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 274, p. 121-129, 1996.
- PINKERT, C. A. Introduction to transgene animals. In: **PINKERT, C. A.** Transgenic animal technology: A Laboratory Handbook. California: Academic Press inc. 1993, p. 3-12.
- PINKERT, C. A.; MURRAY, J. D. Transgenic farm animals. In: **MURRAY, J. D.; OBERBAUER, G.B.; McGLOUGHLIN, M. M.** Transgenic Animals in Agriculture. Nova York: CAB publishing, 1999, p. 1-18.
- PITTOGGI, C.; ZACCAGNINI, G.; GIORDANO, R.; MAGNANO, A. R.; BACCETTI, B.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retroposition and foreign DNA integration. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 248-251, 2000.
- RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction, **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1043-1051, 2002.
- RIETH, A.; POTHIER, F.; SIRARD, M. C. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 338-345, 2000.
- ROTTMANN O. J.; ANTES, R.; HOFER, P. Maierhofer, G. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 109, p. 64-70, 1991.
- ROTTMANN O. J.; ANTES, R.; HOFER, P.; SOMMER, B.; WANNER, G.; GORLACH, A.; GRUMMT, F.; PIRCHNER, F. Liposome-mediated gene transfer via sperm cells. High transfer efficiency and persistence of transgenes by use of liposomes and sperm cells and a murine amplification element. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 113, p. 401-411, 1996.
- SHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. **Animal Biotechnology**, v. 6, p. 41-50, 1995.

SCHURMANN, A.; AXER, H.; SCHEEPERS, A.; DOEGE, H.; JOOST, H. G. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa, **Cell and Tissue Research**, v. 307, p. 237-242, 2002.

SCHWARTZMA, R. A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology programmed cell death. **Endocrinology Reviews**, v. 14, p. 133-151, 1993.

SILVA, P. N. F.; GADELLA, B. M. Detaction of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SIN, F. Y. T.; WALKER, S. P.; SIN, I. L.; SYMONDS, J. E.; MUKHERJEE, U. K.; KHOO, J. G. I. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: Efficiency, realiability, and fate of transgene. **Molecular Reproduction Development**, v. 56, p. 285-288, 2000.

SMITH, K.; SPADAFORA, C. Sperm-mediated gene transfer: Applications and implications. **Molecular Reproduction Development**, v. 25, p. 551-62, 2005.

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

SPERANDIO, S.; LULLI, V.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MAIONE, B.; SPADAFORA, C.; LAVITRANO, M. L. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. **Animal Biotechnology**, v. 7, p. 59-77, 1996.

SYMONDS, J. E.; WALKER, S. P.; SIN, F.Y.T. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA - evidence of enhanced sperm DNA association. **Aquaculture**, v. 119, p. 313-327, 1994.

TANGHE, S.; VAN SOON, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p.127-132, 2002.

TANIGAWA, Y.; YOSHIHARA, K.; KOIDE, S. S. Endonuclease activity in bull semen, testis and accessory sex organs. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 464-470, 1975.

TRAVIS, A. J.; FOSTER, J. A.; ROSENBAUM, N. A.; VISCONTI, P. E.; GERTON, G. L.; KOPF, G. S.; MOSS, S. B. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous

sheath of murine spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**. v. 9, p. 263-276, 1998.

TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v. 241, p. 384-393, 1998.

TSAI, H. J.; LAI, C. H.; YANG, H. S. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor* suportexta). **Transgenic Research**, v. 6, p. 85-95, 1997.

VANHOVE, B.; RENARD, J. P.; SOULILLON, J. P. Genetic engineering in the pig. Gene knockout and Alternative Techniques. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 862, p. 28-36, 1998.

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

ZHONG, J. Y.; WABG, Y. P.; ZHU, Z. Y. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. **Aquaculture**, v. 214, p. 93-101, 2002.

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

WALL, R. J. New gene transfer methods. **Theriogenology**, v. 57, p. 189-201, 2002.

WALL, R. J. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. **Theriogenology**, v. 45, p. 57-68, 1996.

WALL, R. J.; HAWK, H. W.; NEI, N. Making transgenic livestock - genetic engineering on a large-scale. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 113-20, 1992.

WANG, H. J.; LIN, A. X.; CHEN, Y. F. Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. **Animal Biotechnology**. v. 14, p. 155-165, 2003.

WESTHOFF, D.; KAMP, G. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 1821-1829, 1997.

WINDSOR, D. P.; WHITE, I. G. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 354-360, 1993.

WOLF, E.; SCHERNTHUNER, W.; ZAKHARTCHENKO, V.; PRELLE, K.; STOJKOVIC, M.; BREM, G. Transgenic technology in farm animals - progress and perspectives. **Experimental Physiology**, v. 85, n. 6, p. 615-25, 2000.

YANG, C. C.; CHANG, H. S.; LIN, C. J.; HSU, C. C.; CHEUNG, J. L.; HWU, L.; CHENG, W. T. K. Cock Spermatozoa Serve as the Gene Vector for Generation of Transgenic Chicken (*Gallus gallus*). **Asian-australasian Journal of Animal Science**, v. 17, p. 885-891, 2004.

ANEXO A**TL-Sêmen**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
NaCl	0,6660 g	Sigma	S-9625
KCl	0,0240 g	Sigma	P-4504
MgCl ₂	0,0100 g	Sigma	M-2393
NaH ₂ PO ₄	0,0041 g	Sigma	S-0876
NaHCO ₃	0,2100 g	Sigma	S-8875
CaCl ₂ H ₂ O	0,0300 g	Sigma	C-7902
Vermelho de Fenol	0,0010 g	Sigma	P-4633
Ácido Lático	143 µl g	Sigma	L-7900
Hepes	0,2380	Sigma	H-0891
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	100 ml	_____	_____

TL-Stock

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
NaCl	0,5820 g	Sigma	S-9625
KCl	0,0230 g	Sigma	P-4504
MgCl ₂	0,0080 g	Sigma	M-2393
NaH ₂ PO ₄	0,0035 g	Sigma	S-0876
NaHCO ₃	0,2100 g	Sigma	S-8875
CaCl ₂ H ₂ O	0,0300 g	Sigma	C-7902
Vermelho de Fenol	0,0010 g	Sigma	P-4633
Ácido Lático	310 µl	Sigma	L-7900
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	100 ml	_____	_____

ANEXO B**Meio de fecundação**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Meio TL-Stock	10 ml	Gibco	12380-028
BSA-V	0,03 g	Sigma	A-9647
Piruvato	20 µl	Sigma	P-4562
Gentamicina	50 µl	Sigma	G-1264

Solução de PBS sem Cálcio e Magnésio

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
NaCl	10 g	Sigma	S-9625
KCl	0,25 g	Sigma	P-4504
Na ₂ PO ₄ 12H ₂ O	1,44 g	Sigma	
KH ₂ PO ₄	0,25 g	Sigma	P-5655
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	1000 ml	_____	_____

ANEXO C**Solução de Percoll 90%**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Percoll	3,6 ml	Sigma	P-1644
CaCl ₂ 2H ₂ O (1M)	8µl	Sigma	C-7902
MgCl ₂ 6H ₂ O (0,1M)	15,6 µl	Sigma	M-2393
Ácido Lático (Lactato de Na)	14,8 µl	Sigma	L-7900
NaHCO ₃	0,0084 g	Sigma	S-8875
Solução 10X	0,4 ml	_____	_____

Solução 10X

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
NaCl	4,675g	Sigma	S-9625
Hepes	2,38g	Sigma	H-0891
KCL 1M	83,09µl	Sigma	P-4504
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 0,1 M	2,92ml	Sigma	S-0876

Solução de CaCl₂ 2H₂O 1M e MgCl₂ 6H₂O 0,1M

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
CaCl ₂ 2H ₂ O 1M	0,147g/ml	Sigma	C-7902
MgCl ₂ 6H ₂ O 0,1M	0,0203g/ml	Sigma	M-2393

Solução de Percoll 45%

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Percoll 90%	1 ml	_____	_____
TL-Sêmen	1 ml	_____	_____

ANEXO D**FITC-PSA (100µg/ml)**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
FITC-PSA	2mg	Sigma	L0770
Azida sódio 10%	2ml	Fisher	BP9221-500
DPBS	18ml	_____	_____

Iodeto de propídeo (0,5mg/ml)

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Iodeto de propídeo	0,5mg	Sigma	P-4170
NaCl (0,9%)	1ml	Sigma	S-5886

JC-1 (76,5µM)

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
JC-1	0,05mg	Molecular Probes	T-3168
DMSO	1ml	Sigma	D-2650

Hoechst 33342 (40µg/ml)

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Hoechst		Sigma	B-2261
DMSO		Sigma	D-2650

ANEXO E**Solução TBE 10X**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Tris	10,8 g	Gibco	5504013
Ácido bórico	5,5 g	Aldrich	339067
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	0,925 g	Gibco	15576-028
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	1000 ml	_____	_____

Solução TAE 10X

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Tris	48,4g	USB	US45825
Ácido acético	11,42ml	Merk	1.00063.1011
Na ₂ EDTA 2H ₂ O 0,5M	20ml	Gibco	15576-028
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	1000 ml	_____	_____

Ajustar o pH para 8,5. Estocar em temperatura ambiente.

Na₂EDTA 0,5M

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	148,9g	Gibco	15576-028
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	800ml	_____	_____

Ajustar o pH para 8,0 com NaOH 6N. Autoclavar a 120°C por 20 minutos

Solução 2YT

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Triptona	16g		
Extrato de levedo	10g		
Cloreto de sódio	5g	Merck	ART 6404
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	1000ml	_____	_____

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N. Autoclavar a 120°C por 20 minutos e estocar em temperatura ambiente.

ANEXO E**2YT-ágar**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Bactoagar	15g		
2YT líquido	1000ml	_____	_____

Autoclavar a 120°C por 20 minutos. Estocar a -8°C.

Ampicilina

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Ampicilina	1,0g	Gibco	11593-019
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	10ml	_____	_____

Dissolver e filtrar em filtro de 0,22µ. Armazenar a -20°C

Gel de agarose

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Agarose	0,3g	Invitrogen	15510-0270
TBE 1X q.s.p	50ml	_____	_____
Brometo de etídeo	1,5µl	Bioagency	161-0433N

Solução de Brometo de etídio

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Brometo de etídio	0,2g	Bioagency	161-0433N
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	20ml	_____	_____

Azul de bromofenol

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Azul de bromofenol		Sigma	B-5525
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p		_____	_____

ANEXO E**Sacarose**

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Sacarose		Sigma	S-1888
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p		_____	_____

T.E

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Tris HCl			
EDTA		Gibco	15576-028

Acetato de sódio

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
Acetato de sódio	1,6406g	Sigma	S-2889
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	100ml	_____	_____

SDS 10%

Reagente	Quantidade	Empresa	Nº Catálogo
SDS	10g	Gibco BRL	15525-025
H ₂ O Ultrapura (MilliQ) q.s.p	100ml	_____	_____