



UDESC

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS
POR POLIFEÇÃO E ELETROPORAÇÃO

ZIGOMAR DA SILVA

Zigomar da Silva

**TRANSFECCÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS POR
POLIFECÇÃO E ELETROPORAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa

Coorientadora: Dra. Mariana Groke Marques

Lages

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio
do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

da Silva, zigomar

TRANSFECÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS POR POLIFECÇÃO E
ELETROPORAÇÃO/Zigomar da Silva. - Lages, 2017.

95p.: il.; 21 cm

Orientador: Carlos André da Veiga Lima-Rosa

Coorientadora: Mariana Groke Marques

Inclui bibliografia

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Transgênico. 2. Espermatozoide. 3. Suíno. 4.
Eletroporação. 5. Polietilenoimina. I. da Silva, Zigomar.
II. da Veiga Lima-Rosa, Carlos André. III. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. IV. Título

Concórdia, 10 de Outubro de 2015.

Parecer referente à tramitação da proposta intitulada "Transfecção de espermatozoides suínos por diferentes métodos: polietilenoimina, e eletroporação", sob responsabilidade da pesquisadora **Mariana Groke Marques** junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Suínos e Aves (CEUA/CNPSA).

Por tratar-se de uma atividade onde não haverá nenhum tipo de contato físico direto com animais, a CEUA/CNPSA entende que a proposta acima citada não necessita da avaliação desta comissão.

Atenciosamente,



Paulo Augusto Esteves
Presidente CEUA/CNPSA

Paulo Augusto Esteves
CPF: 25636030
Matrícula: 320571

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: da Silva, Zigomar

Título: Transfecção de espermatozoides suínos por polifecção e eletroporação

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência

Animal

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Dra. Mariana Groke marques

Instituição: EMBRAPA

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dr. José Rodrigo Claudio Pandolfi

Instituição: EMBRAPA

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dra. Carla Ivane Vogel

Instituição: UDESC

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha namorada, meu anjo, meu tudo, Gabi por todo o seu amor e carinho, além de todo o apoio e incentivo à mim dispensado. Quem sempre esteve e sempre está me apoiando em tudo. Eu nada realizaria sem você ao meu lado.

Aos meus pais e minha família, por todo o incentivo e apoio.

Agradeço muitíssimo ao Prof. Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa, por ter aceito como orientador.

À Dra. Mariana Groke Marques, agradeço pela coorientação e a oportunidade para desenvolver meu experimento na Embrapa Suínos e Aves. Foi um grande prazer ter sido seu orientado. Proporcionou-me grande conhecimento e enriquecimento profissional, não só pelo aprendizado teórico e prático em relação a área de atuação, mas também quanto ao profissionalismo.

Ainda, agradeço grandemente a Andressa, pelo apoio intelectual na execução do experimento e, ao Dahmer, pelo suporte técnico dispensado.

Aos pesquisadores da Embrapa, José Rodrigo Claudio Pandolfi pelo auxílio na obtenção dos plasmídeos.

Ana Paula Bastos pela ajuda na idealização deste projeto de pesquisa.

Ao Francisco Noé pela ajuda com as formulações da PEI.

A Embrapa Suínos e Aves e todos os seus colaboradores que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Stefan Moisyadi, da Universidade do Havaí (EUA), por ter, gentilmente, doado os vetores plasmidiais, para as transfecções.

Por fim, a Coordenadoria de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, a qual me permitiu ter a condição financeira para tal empreitada.

George Bernard Shaw disse certa vez que “a ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”, porém, temos que concordar com Isaac Asimov que, “se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los”.

Albert Einstein, além de toda sua física, também nos ensinou que “toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil. No entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

Na construção do conhecimento científico, nada parece fazer mais sentido do que o dito por Benjamin Disraeli: “o que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece” e que é complementado por Arthur Schopenhauer que diz que “a tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

RESUMO

SILVA, ZIGOMAR DA. **Transfecção de espermatozoides suínos por polifecção e eletroporação**. 2017. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pósgraduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Suínos transgênicos são criados para várias finalidades, podendo ser usados como biorreatores ou como modelos para estudos de doenças humanas e na pecuária. Estes podem ser obtidos por várias metodologias, porém, devido a sua simplicidade e baixo custo, a transgenia mediada por espermatozoide apresenta-se como uma metodologia bastante promissora. Visando aumentar a eficiência desta técnica, em outras espécies

são usados métodos químicos, como a polifecção utilizando a polietilenoimina (PEI) e físicos, como a eletroporação, que possibilitam aos espermatozoides captarem maiores quantidades de DNA exógeno (eDNA), mas nenhum destes está padronizado para suínos. O objetivo deste estudo foi otimizar protocolos para o uso da eletroporação e da polifecção utilizando a polietilenoimina na transfecção de espermatozoides suínos e definir qual destes métodos é o mais eficiente. Para isso, utilizou-se doses inseminantes de 10 machos suínos de linhagens comerciais, que foram divididas em amostras de 2×10^6 spz/mL. Para a padronização da eletroporação estas amostras foram testadas duas voltagens (500 ou 1000 volts) em um pulso único ou duplo, com duas durações de pulso (250 ou 500 μ s). Já para a padronização da PEI foram testadas quatro diferentes concentrações (0,5, 1, 2 ou 4) mg/mL de PEI, marcada com a sonda FITC, incubando-se durante 10 minutos, 2 e 4 horas. Os dois melhores protocolos para cada um dos métodos foram analisados por citometria de fluxo quanto a viabilidade celular, empregando-se as sondas FITC, PI, laranja de acridina e JC1, as quais, avaliam, respectivamente, a integridade de membrana, de acrossoma, de cromatina e potencial mitocondrial. O protocolo, de cada método, que apresentou melhor viabilidade celular foi utilizado na transfecção com o plasmídeo pmhyGENIE-5, sendo que para a eletroporação elegeu-se 500 volts, 500 μ s e 2 pulsos e para a PEI o melhor protocolo foi 0,5mg/mL, com incubação de 10 minutos. Após, uma alíquota das amostras foi utilizada para avaliação da viabilidade celular, por citometria de fluxo e outra alíquota foi destinada a hibridização *in situ* fluorescente, para a detecção do plasmídeo nos espermatozoides. A FISH foi realizada utilizando duas sondas, ambas com 200 bases cada. Como teste, utilizouse uma sonda para o gene EGPF do plasmídeo, marcada com o fluoróforo Cyanine 5, e como controle da reação, uma sonda para o gene cromossômico suíno SRY, esta marcada com Cyanine 3. A avaliação das lâminas da FISH foi realizada em microscópio de fluorescência (Axio Observer A1, Carl Zeiss), pela contagem de 100 espermatozoides por lâmina e a observação do número de marcações para cada uma das sondas. O método de incubação, que foi utilizado como controle demonstrou uma taxa de transfecção de $17,80\% \pm 1,07$. A eletroporação teve $36,70\% \pm 2,78$ de eficiência, enquanto a taxa de transfecção da PEI foi de $76,8\% \pm 3,09$, demonstrando que estes métodos foram mais eficientes que a incubação. A eletroporação, apesar da maior taxa de transfecção, este método causou grande taxa de lesão de acrossoma. A polifecção, da mesma forma, teve alta taxa de lesão de acrossoma, bem como de membrana citoplasmática. Devido a isso, é recomendável que os espermatozoides transfectados por estes métodos sejam utilizados em técnicas de fertilização, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

Palavras-chave: transgênico, espermatozoide, suíno, eletroporação, polietilenoimina.

ABSTRACT

SILVA, ZIGOMAR DA. **Transfection of porcine sperm by polyfection and electroporation**. 2017. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pósgraduação em Ciência Animal, Lages, 2017

Production of transgenic swine have been for various purposes as well as bioreactors or as models for studies of human diseases and livestock. Your achievement can be by several methodologies, however, due to their simplicity and low cost, spermatozoidmediated transgenic (SMGT) is a promising methodology. In order to increase the efficiency of this technique, in other species chemical methods such as polyfection by polyethyleneimine (PEI) and physical, such as electroporation, are used that allow spermatozoa to capture larger amounts of exogenous DNA (eDNA), but none of these are standardized for swine. The objective of this study was to optimize protocols for the use of electroporation and polyfection by polyethyleneimine in the transfection of swine spermatozoa and to define which of these methods is the most efficient. Dilution of inseminating doses of 10 boars of commercial strains were in BTS to obtain samples with 200 μ L and 2x10⁶spzt / mL, which composed the experimental groups. For standardization of electroporation, these samples were tested two voltages (500 or 1000 volts) on a single or double pulse, with two pulse durations (250 or 500 μ s). For the PEI standardization, four different concentrations (0.5, 1, 2 or 4) mg / mL PEI labeled FITC were incubated for 10 minutes, 2 and 4 hours. Cell viability of two best protocols for each of the methods was by flow cytometry, using the FITC, PI, acridine orange and JC1 probes, which respectively evaluate membrane integrity, acrosome, of chromatin and mitochondrial potential. The protocol, of each method, that presented better cellular viability was used in the transfection with the plasmid pmhyGENIE-5. Then for the electroporation, the best protocol was 500 volts, 500 μ s and 2 pulses while the best protocol of polyfection was 0.5 mg/mL, with incubation of 10 minutes. Afterwards, cell viability of an aliquot of the samples was by flow cytometry and the detection of the plasmid in spermatozoa was by fluorescence in situ hybridization in another aliquot of the samples. FISH was using two probes, both with 200 bases each. A probe for the EGPF gene of the plasmid labeled with the fluorophore Cyanine 5 was the test probe, and a Cyanine 3 labeled-probe for the SRY swine chromosomal gene was the control probe. The evaluation of the FISH sheets was by fluorescence microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss), by counting 100 sperm per slide and observing the number of markings for each of the probes. The incubation method, which was the control, demonstrated a transfection rate of 17.80% \pm 1.07. Electroporation had an efficiency of 36.70 \pm 2.78, whereas the polyfection transfection rate was 76.8% \pm 3.09, demonstrating that these methods were more efficient than incubation. Electroporation, despite the higher rate of transfection, this method caused a great rate of acrosome lesion. Polyfection, similarly, had high rate of acrosome lesion as well as cytoplasmic membrane. Because of this, recommendable it is that spermatozoa transfected by these methods be used in in vitro fertilization biotechniques, such as ICSI.

Keywords: transgenic, spermatozoa, swine, electroporation, polyethyleneimine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Linha do tempo da história da transgenia em animais.....	30
Figura 02 - Mecanismos moleculares da SMGT.....	36

Figura 03 - Leitura e análise do branco na citometria de fluxo.....	43
Figura 04 - Citometria de fluxo para avaliação da incorporação de PEI/FITC.....	44
Figura 05 – Citometria de fluxo na avaliação da incorporação de Iodeto de Propídio.....	46
Figura 06 – Citometria de fluxo para análise do potencial de membrana mitocondrial.....	50
Figura 07 - Representação esquemática do delineamento do experimento 1.....	52
Figura 08 - Representação esquemática do delineamento do experimento 2.....	53
Figura 09 - Representação esquemática do delineamento do experimento 3.....	54
Figura 10 - Representação esquemática do delineamento do experimento 4.....	55
Figura 11 – Representação esquemática do delineamento do experimento 5.....	56
Figura 12 – Incorporação de PEI por espermatozoides suínos.....	63
Figura 13 – Avaliação da viabilidade espermática de espermatozoides suínos tratados com PEI.....	65
Figura 14 – Formula para o cálculo da recuperação da membrana plasmática de espermatozoides submetidos a eletroporação.....	68
Figura 15 - Interação entre o meio e a temperatura na recuperação espermática pós-eletroporação.....	68
Figura 16 - Interação entre o meio e eletroporação na recuperação espermática pós-eletroporação.....	70
Figura 17 – Incorporação de Iodeto de Propídio conforme o parâmetro de	

eletroporação utilizado.....	71
Figura 18 - Avaliação da viabilidade de espermatozoides suínos submetidos à eletroporação.....	72
Figura 19 – Avaliação da viabilidade de espermatozoides suínos submetidos a diferentes métodos de transfecção.....	74
Figura 20 – Transfecção de espermatozoides suínos por diferentes metodologias.....	78
Figura 21 – Espermatozoides suínos, marcação controle com Cy3 para o gene SRY na FISH.....	79
Figura 22 – Espermatozoides suínos, marcação com Cy5 (setas) para o gene eGFP do plasmídeo pmhyGENIE-5 na FISH.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

Cl	Cloro;
cm	Centímetro; Dr. Doutor;
EP	Eletroporação;
FL	Filtro g
g	Gramas;
h	Hora;
H ⁺	Hidrogênio ionóforo;
kb	Quilobase;
kDa	Quilodalton;
Log	Logaritmo;
Ltda.	Limitada;
M	Molar;
mg	Miligrama;
mg/mL	Miligrama por mililitro;
	mg/μL Miligrama por microlitro;
mM	Milimolar;
ms	Milisegundo;
Na	Sódio;
ng	Nanograma;
n ^o	Número;

pb	Pares de bases; PEI
	Polietilenoimina; pH
	Potencial Hidrogeniônico;
PLF	Polifecção;
s	Segundo;
Sptz	Espermatozoide; μg microgramas;
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	microgramas por microlitro;
μL	Microlitros; μM micromolar; μs microssegundos;
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius; LISTA DE SIGLAS

bPMM	baixo Potencial de Membrana Mitocondrial;
CCCP	Carbonil-cianeto 3-clorfenilhidarzone (do inglês, <i>Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone</i>);
CD4	Cluster de Diferenciação 4;
cDNA	DNA Complementar (do inglês <i>complementary DNA</i>);
CHO	células ovarianas de hamister chinês);
COS	(células originadas de CV1 que suportam SV40)
Cy3	Cianina 3 (do inglês <i>Cyanine 3</i>);
Cy5	Cianina 5 (do inglês <i>Cyanine 5</i>);
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Desoxirribonucleic Acid</i>);
DTT	Ditiotreitol;
eDNA	DNA exógeno (do inglês <i>DNA</i>);
eGFP	Proteína fluorescente verde (do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>);
ES	Células Tronco embrionária (do inglês <i>Embryonic Stem Cell</i>);
fdNA	fragmentação de DNA;
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (do inglês <i>Fluorescent in situ Hybridization</i>);
FITC-PSA	Isotiocianato de Fluoresceína conjugada à Aglutinina de <i>Psum sativum</i> (do inglês <i>Agglutinin from Pisum sativum FITC conjugate</i>);
GFP	Proteína fluorescente verde (do inglês <i>Green Fluorescent</i>

	<i>Protein</i>);
HCl	Ácido Clorídrico;
hDAF	fator acelerador da decomposição humano (do inglês <i>human decay-accelerating factor</i>);
HEK	Células renais embrionárias
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana;
hMCP	proteína cofator de membrana humano (do inglês <i>human membrane cofactor protein</i>);
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (do inglês <i>Intracitoplasmatic Sperm Injection</i>);
IF-1	Fator Inibitório 1 (do inglês <i>Inhibitory Factor-1</i>);
IMC	Integridade de Membrana Citoplasmática;
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide;
Kv	Quilovolts;
LA	Lesão acrossomal;
LMC	Lesão de Membrana citoplasmática;
MHCII	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (do inglês Major histocompatibility Complexo of Class II);
MII	Metafase II;
MNP	nanopartículas magnéticas (do inglês, <i>magnetics nanoparticles</i>);
mTBM	modified Tyrodes Buffered Medium;
OA	Laranja de Acridina (do inglês <i>Acridine Orange</i>);
PBS	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline;
PI	Iodeto de Propídio (do inglês <i>Propidium Iodide</i>);
PID1	(Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1);
PMI	Microinjeção Pronuclear (do inglês <i>pronuclear micro-injection</i>);
PMM	Potencial de membrana mitocondrial;
RCF	Força Centrífuga Relativa;
RIMP	Recuperação da Integridade de Membrana Plasmática;
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>);
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas (do inglês <i>Somatic cell nuclear transfer</i>);

SMGT	Transferência Genica Mediada por espermatozoides (do inglês <i>sperm mediated gene transfer</i>);
SRY	Gene da região do Y para a determinação sexual (do inglês, <i>sexdetermining region Y</i>);
SSC	Solução de Citrato de Sódio;
TMGT	Transferência Genica mediada pelos testículos (do inglês <i>Testis mediated gene transfer</i>);

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	JUSTIFICATIVA E FORMULAÇÃO DO PROBLEMA.....	25
3	HIPÓTESES.....	26
4	OBJETIVOS.....	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
5.1	HISTÓRICO E FINALIDADE DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS.....	28
5.2	METODOLOGIAS PARA A PRODUÇÃO DE SUÍNOS TRANSGÊNICOS.....	30
5.3	A TRANSGENIA MEDIADA POR ESPERMATOZOIDE.....	33
5.3.1	Mecanismos moleculares da SMGT.....	34
5.3.2	Fatores que afetam a SMGT.....	36
5.3.3	Métodos para aumentar a eficiência da SMGT.....	37
5.3.3.1	<i>Eletroporação</i>	38
5.3.3.2	<i>Polifecção</i>	39
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
6.1	ANIMAIS E PROTOCOLO DE BIOÉTICA.....	41
6.2	AVALIAÇÕES SEMINAIS.....	41
6.2.1	Motilidade	41
6.2.2	Concentração	41
6.2.3	Citometria de fluxo	42
6.2.3.1	<i>Avaliação da incorporação da PEI</i>	44
6.2.3.2	<i>Avaliação da incorporação de Iodeto de Propídio por espermatozoides submetidos a eletroporação</i>	45

6.2.3.3	<i>Sondas para avaliação da viabilidade espermática</i>	46
6.2.3.3.1	Integridade de Acrossoma.....	46
6.2.3.3.2	Integridade de Membrana Citoplasmática.....	47
6.2.3.3.3	Integridade de Cromatina.....	47
6.2.3.3.4	Potencial de membrana mitocondrial.....	48
6.3	ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA POLIFECÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS UTILIZANDO PEI.....	51
6.3.1	Experimento 1. Determinação da concentração e tempo de incubação da PEI utilizando PEI/FITC.....	51
6.3.2	Experimento 2. Efeito da Polietilenoimina na viabilidade espermática de espermatozoides suínos.....	52
6.4	OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS UTILIZANDO ELETROPORAÇÃO....	53
6.4.1	Experimento 3. Otimização do meio e da temperatura para a recuperação espermática pós eletroporação.....	53
6.4.2	Experimento 4. Determinação da voltagem, número de pulsos e tempo para eletroporação de espermatozoide suínos.....	55
6.4.3	Experimento 5. Efeito da eletroporação na viabilidade espermática de espermatozoides suínos.....	56
6.5	TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS UTILIZANDO-SE POLIFECÇÃO E ELETROPORAÇÃO.....	57
6.5.1	Obtenção do vetor plasmídeo PiggyBac pmhyGENIE-5.....	57
6.5.1.1	<i>Transformação Bacteriana.....</i>	57
6.5.1.2	<i>Sequenciamento dos insertos.....</i>	57
6.5.1.3	<i>Análise das sequências obtidas.....</i>	58
6.5.2	Experimento 6. Efeito da transfecção por polifecção, eletroporação e incubação na viabilidade de espermatozoides suínos.....	58
6.5.2.1	<i>Método da Polifecção.....</i>	58
6.5.2.2	<i>Método da Eletroporação.....</i>	59
6.5.2.3	<i>Método da Incubação (controle).....</i>	59

6.5.3	Experimento	7.	Comparação	das	técnicas	da	
	polifecção, eletroporação e incubação na transfecção de espermatozoides						
	suínos.....						60
	ANALISE ESTATÍSTICA.....						62
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....						63
7.1	EXPERIMENTO 1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO						
	DE INCUBAÇÃO DA PEI UTILIZANDO PEI/FIC.....						63
7.2	EXPERIMENTO 2. EFEITO DA POLIETILENOIMINA NA VIABILIDADE						
	ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDEOS SUÍNOS.....						65
7.3	EXPERIMENTO 3. OTIMIZAÇÃO DO MEIO E DA TEMPERATURA						
	PARA A RECUPERAÇÃO ESPERMÁTICA PÓS						
	ELETROPORAÇÃO.....						67
7.4	EXPERIMENTO 4. DETERMINAÇÃO DA VOLTAGEM, TEMPO E NÚMERO DE						
	PULSOS PARA ELETROPORAÇÃO DE						
	ESPERMATOZOIDE SUÍNOS.....						70
7.5	EXPERIMENTO 5. EFEITO DA ELETROPORAÇÃO NA VIABILIDADE						
	ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDEOS SUÍNOS.....						71
7.6	EXPERIMENTO 6. EFEITO DA TRANSFECÇÃO USANDO						
	POLIFECÇÃO E ELETROPORAÇÃO NA VIABILIDADE						
	DE						
	ESPERMATOZOIDEOS SUÍNOS.....						74
7.7	EXPERIMENTO 7. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS POLIFECÇÃO,						
	ELETROPORAÇÃO E INCUBAÇÃO NA						
	TRANSFECÇÃO DE						
	ESPERMATOZOIDEOS SUÍNOS.....						78
8	CONCLUSÃO.....						81
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....						82
	REFERÊNCIAS.....						83
	ANEXOS.....						93

1. INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 50 anos, esforços são conduzidos para a produção de animais transgênicos, haja vista os trabalhos de Jaenisch e Mintz (1974). O desejo dos cientistas de produzirem este tipo de animais dá-se pelas suas potenciais aplicações. Dentre estas, as que mais se destacam são o uso destes com interesses biomédicos, tais como biorreatores, ou seja, para a produção de proteínas de finalidade farmacológica, além de seu uso como modelos para estudos de doenças humanas de causa hereditária e ainda, como doadores de tecidos e potencialmente órgãos, para o xenotransplante (WHITELOW et al., 1999). A transgenia pode, também ser utilizada para o estudo do funcionamento genético e ainda, uma ferramenta de grande valia para o melhoramento genético de animais pecuários (PINKERT, 2000).

Quando se pensa em produzir animais transgênicos, duas coisas são importantes de se levar em consideração. Primeiro, qual a espécie animal a ser empregada, que deve ser apropriada a finalidade deste transgênico e que, conseqüentemente, leva ao segundo ponto, que é a escolha da metodologia a ser utilizada para gerar estes animais. Em se tratando de melhoramento genético ou estudo da função gênica, qualquer espécie pode ser empregada. No entanto, quando se trata de animais transgênicos para a pesquisa biomédica, fatores como a semelhança anatômica e fisiológica entre humanos e a espécie utilizada, devem ser levados em consideração. Neste sentido, suínos são animais largamente utilizados, pois possuem, na fisiologia e na anatomia de alguns órgãos, muita semelhança com humanos.

Para a geração de suínos transgênicos, várias são as metodologias que estão disponíveis e podem ser utilizadas, entretanto, a transferência gênica mediada por espermatozoide (SMGT, do inglês: *sperm mediated gene transfer*) tem despontado como uma das técnicas mais promissoras, por sua simplicidade e baixo custo.

A SMGT foi inicialmente relatada em 1971 por Brackett e colaboradores, que demonstraram pela primeira vez que espermatozoides de mamíferos conseguem incorporar em seu genoma DNA heterólogo, ou seja, no caso, DNA de partículas virais com as quais os espermatozoides tinham sido previamente incubados. Porém, desta experiência não foram gerados animais e a técnica não foi percebida como possível método de transgenia.

Os primeiros animais transgênicos foram ratos, obtidos por Jaenisch e Mintz, em 1974, pela injeção de DNA do vírus Símio 40 (SV40) em blastocistos. A produção de animais, transgênicos só obteve repetibilidade a partir de 1980, quando Gordon et al., desenvolveu a técnica de microinjeção prônuclear (PMI, do inglês: Pronuclear Microinjection). Esta metodologia é eficiente para geração, principalmente, de ratos transgênicos, mas de difícil execução em outros animais, como os suínos, embora os primeiros suínos transgênicos tenham sido gerados pela PMI, por Hammer et al., (1985).

A SMGT foi redescoberta em 1989, quando dois artigos relatando o uso desta metodologia foram publicados. Arezzo et al., (1989) obteve ouriços-do-mar, enquanto Lavitrano et al., 1989, conseguiu ratos transgênicos, utilizando espermatozoides como vetor para carrear eDNA (DNA exógeno) para o oócito. O primeiro trabalho utilizando a SMGT em suínos foi o realizado por Horan, et al., (1991). Depois disso, diversos trabalhos têm demonstrado sua utilização para este fim, tais como, Lavitrano, et al., (1999), Cabot et al., (2001), Bacci, et al., (2009), Zaniboni, et al., (2016) e muitos outros.

A SMGT é uma técnica simples e promissora, porém, sua eficácia e repetitividade são controversas. Para que se torne mais eficiente é necessária a compreensão dos mecanismos moleculares dos espermatozoides para a captação e internalização de eDNA e de sua integralização ao genoma espermático. Ainda, há a possibilidade da combinação da SMGT com outros métodos, para melhorar sua eficácia.

Métodos físicos, sendo o principal a eletroporação, e químicos, como transfecção de espermatozoide por DNA conjugado a lipídeos (lipofecção) ou polímeros (polifecção), ou ainda, a permeabilização da membrana espermática vem sendo utilizados com variados graus sucesso em outras espécies. Todavia, em suínos, uma espécie particularmente importante na transgenia, estes métodos têm sido pouco estudados.

Este estudo tem por objetivo otimizar e padronizar a eletroporação e a polifecção com a polietilenoimina (PEI), além de compará-las, afim de definir qual dessas duas técnicas é a mais eficientes para a transfecção de espermatozoides suínos.

2. JUSTIFICATIVA E FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

O uso da transgenia, técnica que permite a transferência de genes de uma espécie para outra, pode possibilitar melhoras na produção de suínos, como já ocorre em outras espécies. Exemplo disso é o salmão transgênico, desenvolvido pela AquaBounty Technology, o qual atinge o tamanho comercial em 50% do tempo necessário e foi o primeiro animal transgênico aprovado para consumo humano nos EUA. A transgenia também pode ser utilizada para tornar os suínos mais ecológicos, como por exemplo, a redução do teor de fosforo excretado nos animais produzidos por Golovan et al., (2001). Também, podem ser criados suínos resistentes as suas próprias doenças, como já ocorreu em bovinos, quando Wall et al. (2005) desenvolveram vacas resistentes à mastite.

Os suínos são animais anatômica e fisiologicamente muito parecidos com os humanos, o que os tornam também ótimos modelos para a pesquisa biomédica. Modificações direcionadas no seu genoma possibilitam que estes animais produzam tecidos ou órgãos para xenotransplante em humanos, proteínas de interesse médico e ainda sejam modelos animais para estudo de doenças humanas (WHITELAW et al., 1999).

A SMGT é uma técnica simples e barata para a geração de suínos transgênicos, entretanto, ainda é pouco eficiente. Existem vários métodos de transfecção tais como a eletroporação e a polifecção, com o uso polietilenoimina, disponíveis para espermatozoides de outras espécies ou outros tipos celulares, os quais se mostram baratos e possibilitam altas taxas de transfecção. Estes métodos, porém, ainda não são empregados na transfecção de espermatozoides suínos com o mesmo sucesso.

Para que a transfecção de espermatozoides suínos possa ser empregada na geração de suínos transgênicos, é necessária a padronização e comparação entre as metodologias disponíveis. Isso levará à otimização dos protocolos e permitirá a escolha de um método que seja seguro, eficaz e com alta reprodutibilidade.

3. HIPÓTESE

A utilização dos métodos eletroporação e polietilenoimina facilitam a internalização do eDNA em espermatozoides suínos, aumentando a eficiência da SMGT.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer protocolos para a eletroporação e uso da polifecção com polietilenoimina para a transfecção de espermatozoides suínos. Comparar a eficácia destes métodos, a fim de determinar qual destes é mais eficiente para a transfecção de espermatozoides suínos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar diferentes protocolos de eletroporação (voltagens e duração e número de pulsos), para obtenção de um protocolo mais eficiente para a eletroporação de espermatozoides suínos.

Comparar a eficiência e a citotoxicidade de diferentes concentrações de PEI, para obtenção de um protocolo eficiente para a polifecção de espermatozoides suínos.

Determinar qual dos métodos de transfecção, eletroporação ou polifecção com PEI, é mais eficiente para a transfecção de espermatozoides suínos.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. HISTÓRICO E FINALIDADE DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Em 1971, Bracket e seus colaboradores estudando as formas de transmissão do Símio Vírus 40 (SV40), perceberam que, quando partículas virais ficavam incubadas com espermatozoides de coelhos, o vírus conseguia adentrar as células e ter seu DNA integrado à cromatina espermática. Porém, esta experiência não foi percebida como metodologia para a produção de animais transgênico, pois não era o almejado por estes pesquisadores.

Três anos mais tarde, em 1974, Jaenisch e Mintz também estudando o SV40, agora na produção de tumores, injetaram partículas virais em blastocistos de camundongos. Nos animais nascidos foi detectado DNA viral em vários órgãos. Estes pesquisadores perceberam a possibilidade de estudar como um gene de uma espécie se comportaria como quando integrando o genoma de outra espécie.

O termo transgênico, no entanto, foi cunhado por Gordon e Ruddle (1981), 10 anos após o primeiro experimento de transgenia, para designar ratos que tiveram adição de DNA de outra espécie em seu genoma, por meio de técnicas laboratoriais. Estas técnicas somadas são chamadas, genericamente, de técnicas de transferência gênica ou de transgenia.

A transferência gênica ou transgenia é uma biotécnica que permite a inserção de um ou mais genes (transgenes) de uma espécie no genoma de outra espécie, possibilitando assim que a última ganhe funções biológicas exclusivas da primeira. Esta pode ser aplicada a qualquer organismo, como bactérias, plantas e também animais.

Os animais transgênicos possuem diversas aplicações e usos, e são principalmente produzidos com interesses biomédicos (WHITELOW et al., 1999). Inicialmente, estes animais eram utilizados para o estudo da função gênica, ou seja, para estudar como determinados genes funcionam. Depois, percebeu-se que, como alguns genes são responsáveis por causar ou predispor a algumas doenças, poderiam ser desenvolvidos animais modelos para estudos de doenças humanas. Estes animais recebiam genes

humanos e desenvolviam as doenças de forma idêntica ou muito semelhante ao que acontece em humanos.

Outra possibilidade seria a inserção de genes que codificam proteínas de interesse farmacológico, assim estes animais transgênicos se transformariam em verdadeiras máquinas de produção de biofarmacos, os chamados animais biorreatores (WHITELAW et al., 1999). As proteínas produzidas podem ser secretadas, por exemplo, no leite, o qual depois de colhido pode ser processado para a extração desses biofarmacos e seu uso. Como exemplo de biorreator, PARK et al. (2006) conseguiu suínos transgênicos, os quais secretavam Eritropoietina Recombinante Humana em seu leite.

Outra utilidade biomédica de animais transgênicos é o xenotransplante, ou seja, o uso de tecidos e possivelmente de órgãos de animais no transplante para humanos. A tecnologia do xenotransplante teve seu início na primeira metade da década de 1960, porém seu insucesso deu-se devido à falta de compatibilidade imunológica entre o animal e o humano (LAZZERESCHI et al., 2000). Com a descoberta da via imunológica da rejeição em transplantes, esta via passou a ser alterada em animais através da inserção de genes humanos específicos, o que torna estes animais mais aptos para “doação” de órgãos para o transplante (LAVITRANO et al., 1997).

Animais com estas características foram produzidos por Zhou et al. (2005), os quais expressavam CD59, em combinação com a proteína cofator de membrana humano (hMCP, do inglês *human membrane cofactor protein*) e o fator acelerador da decomposição humano (hDAF, do inglês *human decay-accelerating factor*). O hDAF também foi expresso em suínos transgênicos produzidos por Lavitrano et al. (1999), Capello et al. (2000), Lazzereschi et al. (2000) e Vargiolu et al. (2010).

Em pecuária, a transgenia pode ser grande aliada à seleção genética clássica, pois consegue alterar uma característica genética específica de forma dirigida (PINKERT, 2000). Através desta biotécnica, podem-se transferir genes responsáveis por características de interesse econômico para animais geneticamente superiores, possibilitando melhoras na produção zootécnica, entretanto, o alto custo desta tecnologia tem limitado a sua aplicação (WALL, 1996).

A transgenia, na zootecnia, tem produzido animais com características produtivas únicas. Exemplo disso é o salmão transgênico, desenvolvido pela AquaBounty Technology, o qual atinge o tamanho comercial em 50% do tempo necessário e foi o

primeiro animal transgênico aprovado para consumo humano nos EUA. Esta biotecnologia também pode ser utilizada para tornar os suínos mais ecológicos, como por exemplo, reduzindo o teor de fosforo excretado nos animais produzidos por Golovan et al. (2001). Também, podem ser criados animais resistentes as suas próprias doenças, como é o caso de suíno resistentes à febre aftosa, obtidos por Wu et al. (2015). Suínos com carne contendo maior marmoreio de gordura também já foram obtidos por transgenia, portando o gene do domínio de interação contendo fosfotirosina 1 (PID1) (FANG et al., 2017).

A seguir, a Figura 1 apresenta um resumo cronológico da evolução da transgenia aplicada a animais:

Figura 1 – Linha do tempo da história da transgenia em animais



Elaborado pelo autor, 2017.

5.2. METODOLOGIAS PARA A PRODUÇÃO DE SUÍNOS TRANSGÊNICOS

Existem muitas formas de transferir genes de uma espécie ou organismo para outro e que envolvem diversos passos. Porém, uma etapa crucial para uma transferência de

genes bem sucedida é a inserção do eDNA em uma célula somática ou gameta, para, a partir daí, gerar o animal transgênico. A introdução de substâncias ou moléculas, como o DNA, em uma célula, através de métodos laboratoriais é denominada transfecção.

Algumas metodologias de transfecção são mais apropriadas para determinadas espécies, já outras são eficientes em praticamente qualquer espécie. Algumas são caras e exigem profissional com alto treinamento, enquanto existem protocolos que utilizam mecanismos próprios da célula, tornando-os de aplicação mais simples. As principais técnicas disponíveis para a geração de suínos transgênicos e suas respectivas taxas de eficiência estão listadas na tabela 1.

suínos

Metodologia	Eficiência em suínos	Referência
Microinjeção pronuclear (PMI)	1–4%	Niemann e kues, 2000
Transgenia seguida de clonagem SCNT-MGT	2%	Wu et al, 2013
Vetores retrovirais	29%	Whitelaw et al, 2004
Transformação genética mediada pelos testículos (TMGT)	20%	CHEN et al, 2005
Transformação genética mediada pelos ovários (OMGT)	8 a 60%	SATO et al, 2003
Transfecção de oócitos	0,0015%	Cabot et al, 2001
Transfecção de células germinativas masculinas (espermatogônias)	19,57%	Kim et al, 1997
Transformação genética mediada por espermatozoide (SMGT)	20 %	Lavitrano et al, 2003

Elaborado pelo autor, 2017.

Tabela 1 – Metodologias e suas respectivas taxas de sucesso para a transgenia em

O primeiro suíno transgênico foi produzido por Hammer et al., (1985) através da PMI de DNA. Esta técnica consiste em inserir, de forma mecânica, material genético exógeno, dentro do pronúcleo de zigotos. A PMI foi desenvolvida por Gordon et al., (1980), obtendo na ocasião, camundongos geneticamente modificados. Esta foi a primeira técnica eficiente e com reprodutibilidade suficiente para gerar animais transgênicos.

A PMI, quando aplicada à produção de ratos transgênicos, é eficiente, em torno de 30%, porém, para animais pecuários, sua eficácia fica em torno de 1–4% (NIEMANN; KUES, 2000; ABDELHAY, 2002; LAVITRANO et al., 2003).

Particularmente em suínos, a opacidade do oócito torna a visualização do seu pronúcleo difícil, requerendo que sejam centrifugados antes da microinjeção

(HAMMER et al., 1985). Além do mais, esta técnica se mostra onerosa, pois exige equipamentos avançados e pessoal altamente capacitado (SMITH, 2004). Ainda, a excessiva manipulação leva a alta letalidade dos embriões (LAVITRANO et al., 2003). A transferência nuclear de células somáticas (SCNT, definir o termo em inglês) é outra técnica para a produção de suínos geneticamente modificados. A SCNT-MGT combina a técnica de clonagem por transferência nuclear com a transgenia, gerando animais transgênicos clonados. Para isso, inicialmente cultivam-se células, geralmente fibroblastos fetais, que serão, então, transfectadas e finalmente é seguida a transferência para oócitos enucleados (LI et al., 2009).

A SCNT-MGT possibilita tanto a inserção quanto a deleção de genes permitindo a geração, respectivamente, de animais transgênicos e nocautes, de maneira eficiente (ZHANG; PIEDRAHITA, 2014). Porém, Wu et al. (2013) citam que esta técnica é ineficiente, pois apenas aproximadamente 2% dos oócitos usados resultam em animais adultos transgênicos, devido a excessiva manipulação.

Vetores retrovirais, ou seja, vírus da família Retroviridae, os quais, devido à capacidade de integrarem seu genoma ao do hospedeiro, foram escolhidos como vetores para a transgenia (NALDINI et al., 1996). Os retrovírus podem adentrar a célula carreando uma sequência de RNA e então, pela atividade da enzima transcriptase reversa, produzir uma cópia de cDNA (DNA complementar, que teve como fita molde o RNA) o qual codifica um gene e o integra ao genoma hospedeiro (SCIAMANNA et al., 2003). Whitelaw et al. (2004), utilizando o vírus da anemia infecciosa equina como vetor, conseguiram obter suínos transgênicos expressando proteína verde fluorescente melhorada (eGFP, do inglês, *enhanced Green Fluorescent Protein*), com 29% de sucesso. Já Zhang et al. (2012) associaram vetores retrovirais com a SMGT (discutida adiante) para a produção destes animais.

A transformação genética mediada por células germinativas é outra metodologia muito utilizada, podendo a transfecção ser realizada no gameta, tanto no espermatozoide quanto no oócito. A transfecção também pode ser realizada nas células primordiais dos gametas, ou seja, nas células dos testículos ou ovários, ainda *in vivo*.

A transformação genética mediada pelos testículos (TMGT, do inglês *Testis Mediated Gene Transfer*) é utilizada para a transformação genética *in vivo*, na qual o eDNA é aplicado por injeção nas espermatogônias, com isso, o animal gerará espermatozoides portadores do referido transgene (CHEN et al., 2005). Neste trabalho, utilizando moluscos gastrópodes (*Haliotis diversicolor supertexta*), foram gerados espermatozoides portadores do transgene com eficiência de aproximadamente 20%.

De forma semelhante, células ovarianas *in vivo* (oogônias) podem receber injeções de plasmídeos, com subsequente eletroporação, possibilitando a geração de oócitos geneticamente modificados, que conseqüentemente, quando fertilizados, resultarão em animais transgênicos (SATO et al., 2003). Neste estudo, obtiveram-se de 8 a 60% de oócitos de ratos transfectados.

Suínos transgênicos também podem ser gerados a partir da transfecção de oócitos. Cabot et al. (2001) produziram suínos transgênicos expressando proteína verde fluorescente (GFP- do inglês *Green Fluorescent Protein*) pela transfecção de oócitos maturados utilizando vetores retrovirais com eficiência de 0,0015%. A fase MII (metáfase II) do ciclo celular deve ser eleita como momento de transfecção, pois o núcleo desta célula encontra-se sem a membrana, facilitando a integração do eDNA ao genoma hospedeiro (CHAN et al., 1998).

A transfecção de células germinativas masculinas também pode ser utilizada para a obtenção de suínos transgênicos. Kim et al. (1997) por microinjeção de túbulos seminíferos de suínos, na região contendo células germinativas, conseguiram obter, em média, 19,57% destes túbulos expressando o gene bacteriano da enzima β galactosidase (LacZ) nestas células. Em ratos, estes autores observaram expressão deste mesmo gene em 7 a 13% dos túbulos seminíferos e, em média, 10,33% nos espermatozoides aí gerados.

A transfecção de espermatozoides também possibilita a geração de suínos transgênicos. A transgenia mediada por espermatozoide ou SMGT, baseia-se na capacidade que o espermatozoide possui de captar e internalizar eDNA.

5.3. A TRANSGENIA MEDIADA POR ESPERMATOZOIDE

A transgenia mediada por espermatozoide, a SMGT foi pela primeira vez relatada por Brackett et al., (1971). Eles observaram que quando partículas do SV40 eram incubadas com espermatozoides, o DNA viral era internalizado e se integrava ao genoma espermático, sendo carregado ao oócito no momento da fecundação. Todavia, à época, esta descoberta não foi percebida como metodologia para a produção de animais transgênicos.

Em 1989, dois artigos isolados foram publicados relatando a transformação genética mediada por espermatozoide em ratos (LAVITRANO et al.) e ouriços-do-mar (AREZZO et al.). No primeiro, Lavitrano et al. (1989) obtiveram ratos transgênicos a partir da incubação de células espermáticas epididimais com plasmídeo linearizado, enquanto no segundo, Arezzo et al. (1989) produziram embriões de três diferentes espécies de ouriços-do-mar a partir de oócitos fecundados com espermatozoides transfectados.

A ideia principal na SMGT é que, ao menos teoricamente, o espermatozoide de qualquer espécie é capaz de captar espontaneamente moléculas exógenas de DNA (LAVITRANO et al., 1997). Este fato se confirma, pois tal método já foi usado em várias espécies como mexilhões (GUERRA et al., 2005), abelhas (ROBINSON et al., 2000), aves (ROTTMAN et al., 1992), bovinos (GAGNÉ et al., 1991; RIETH, 2000, ANZAR e BUHR, 2006), caprinos (PRAMOD et al., 2015), equinos (BALL et al., 2006) e suínos (ZHANG et al., 2012).

Comparada com outras metodologias, a SMGT é uma boa alternativa para a produção de animais transgênicos, principalmente nas espécies as quais a microinjeção não é factível. Além disso, é uma técnica mais barata, pois não há a necessidade de equipamentos dispendiosos. Sua eficiência é outro ponto favorável, pois pode ultrapassar os 80% de sucesso (LAVITRANO et al., 2003).

Uma forma ainda mais eficiente de produzir animais transgênicos é usando a ICSI-SMGT, que é a combinação da SMGT com a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês *Intracitoplasmatic Sperm Injection*) (PEREYRABONNET et al., 2008). A ICSI é uma técnica de reprodução assistida, que consiste em injetar o espermatozoide diretamente dentro do oócito (LÓPEZ-SAUCEDOA, et al., 2012).

5.3.1. Mecanismos moleculares da SMGT

Para a geração de animais transgênicos mediada por espermatozoide é essencial que o eDNA, inicialmente, se ligue ao espermatozoide, em seguida internalize-se ao núcleo do espermatozoide e então se integre ao genoma espermático, o que não é fruto do total acaso. Esta sequência de eventos é, em partes, de natureza imunológica (Figura 02).

A ligação do eDNA ao espermatozoide ocorre, na maioria dos casos, na cabeça, mais especificamente, na região subacrossomal, uma área externa ao espermatozoide muito próxima ao núcleo (FRANCOLINI et al., 1993). Lavitrano et al. (1992) identificaram proteínas com peso molecular de 30-35 kDa, semelhantes a CD4 (CD4, do inglês, Cluster of Differentiation 4), denominadas DNA *bindings proteins*, as quais estão presentes na cabeça do espermatozoide e atuam facilitando este processo. Estas mesmas também foram encontradas por Zani et al. (1995), que também encontraram outras duas proteínas, com pesos moleculares de 50 kDa e 20 kDa.

O CD4 é uma glicoproteína de cadeia única, com 55 kDa, pertencente a superfamília das imunoglobulinas e encontrada nos linfócitos T auxiliares (TIZARD, 2014). Esta molécula foi detectada em espermatozoides humanos, atuando como receptor para antígenos do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (GOBERT et al., 1990; GUARDIOLA et al., 1991). Também foi detectada em ratos nocautes por Lavitrano et al. (1997), atuando na entrada do eDNA no núcleo espermático (Figura 2C).

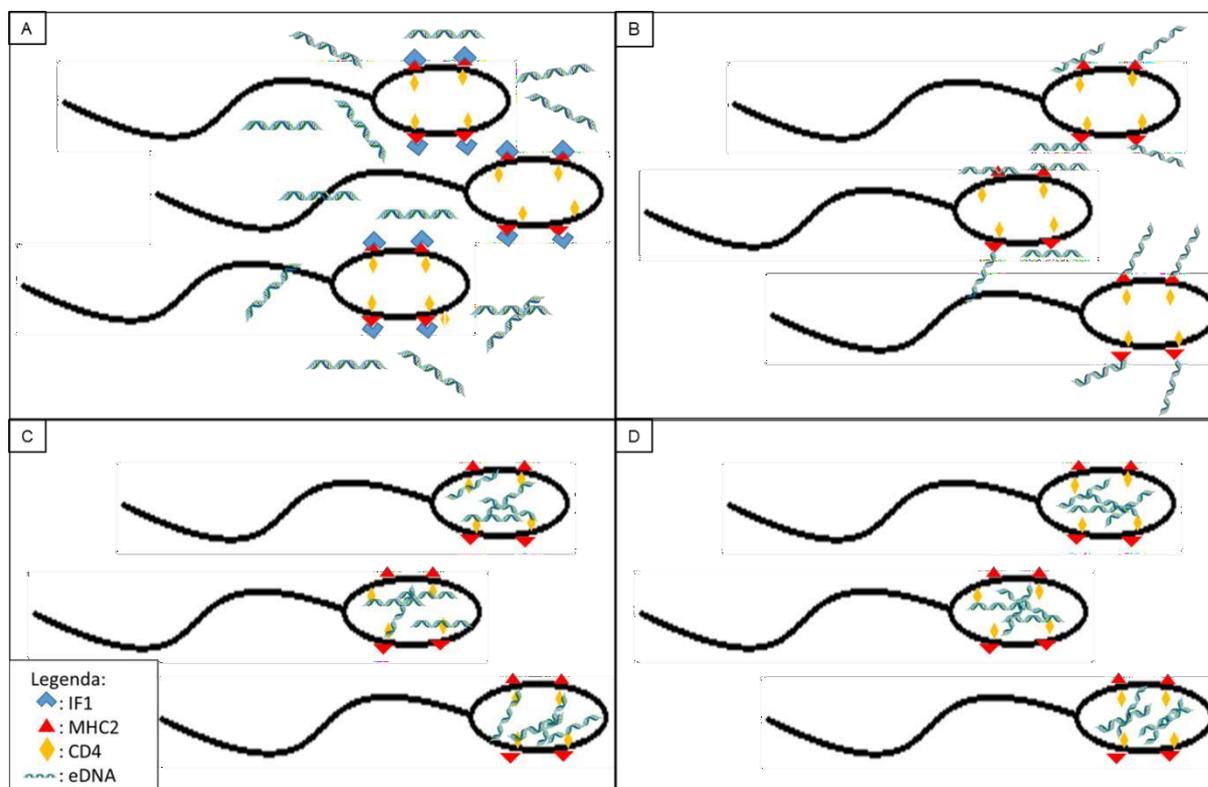
Conforme Francolini et al. (1993), entre 15 a 20% do DNA ligado a espermatozoide epididimal de ratos é internalizado no núcleo. Esta internalização é necessária para que possa integrar-se a cromatina espermática. Em caprinos (*Capra hircus*), tal proteína também foi relacionada à ligação do eDNA com o espermatozoide (WANG et al., 2011). Estes pesquisadores demonstraram neste trabalho que espermatozoides de caprinos portadores de um polimorfismo no éxon 6 do gene de CD4 são mais aptos a internalizar eDNA do que os não-portadores.

Lavitrano et al. (1997), utilizando ratos nocautes, identificaram ainda outra classe de proteínas, as do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC-II, do inglês *Major Histocompatibility Complex Class II*), contribuindo na ligação do eDNA ao espermatozoide (Figura 2B). MHC-II é uma molécula do sistema imune, um heterodímero composto por duas proteínas transmembrana (α e β), que estão presentes nas células apresentadoras de antígenos, se ligando a estes e após,

aderindo aos receptores CD4 dos linfócitos T auxiliares (OTTAVIANI et al., 2008; TIZARD, 2014).

Estas informações explicitam que MHC-II e CD4 desempenham funções essenciais na transgênese mediada por espermatozoide, sendo melhor compreendidas em ratos, porém ainda não se conhece se possuem alguma participação em suínos.

Figura 02 - Mecanismos moleculares da SMGT



Na presença de IF1 ligado ao MHC2, o eDNA não é captado pelo espermatozoide (A). Na ausência de IF1 (B), o eDNA é captado, ligando-se ao MHC2 e (C) internalizado, sendo transferido do MHC2 para o CD4; em D, o eDNA é liberado no núcleo do espermatozoide. Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

5.3.2. Fatores que afetam a SMGT

Para que se tenha sucesso na SMGT em suínos, temos que considerar vários fatores, os quais estão presentes tanto nos espermatozoides, quanto na transfecção ou ainda nos plasmídeos. Parâmetros qualitativos da avaliação de sêmen usados

rotineiramente na reprodução animal convencional, tais como volume, concentração, presença de espermatozoides anormais, motilidade na coleta e alta motilidade progressiva após duas horas da coleta, também devem ser aplicados ao sêmen usado na SMGT (LAVITRANO et al., 2003).

Conforme Lavitrano et al. (2003), a capacidade do espermatozoide em captar moléculas de eDNA esta correlacionada com alta motilidade progressiva após a lavagem dos espermatozoides para remoção do fluido seminal. Este procedimento de lavagem é importante que seja realizado para remover o IF-1, aumentando-se a capacidade dos espermatozoides captarem moléculas de DNA (LAVITRANO et al., 2003). Proteínas denominadas Fator Inibitório-1 (IF-1, do inglês *Inhibitory Factor-1*), que antagonizam o processo de ligação do eDNA com as proteínas ligantes ao DNA, foram encontradas por Lavitrano et al. (1992) no fluído espermático.

Quanto à incubação com o DNA, o tempo para iniciar após a lavagem dos espermatozoides, não deve ser inferior a 30 minutos ou superior a 60 minutos. A interação entre DNA e espermatozoide é otimizada entre 2 e 4 horas, com a temperatura devendo situar-se entre 17 e 20 °C (LAVITRANO et al., 2003). Neste mesmo sentido, Zhang et al. (2012), usando Lentivírus como vetor, relataram que após 4 horas, diminui-se a captação de DNA pelos espermatozoides.

Relacionado aos plasmídeos, a topologia destes é importante ser considerada. Plasmídeos circulares são aproximadamente 8 vezes mais hábeis em se ligar ao espermatozoide do que os lineares (ODDI et al., 2012). A quantidade de plasmídeo a ser incubado com espermatozoides, conforme Lavitrano et al. (2003), não deve ser superior a 400 ng/1 milhão de espermatozoides. Lavitrano et al. (1992) encontraram ainda que as moléculas maiores de DNA (~7 kb) são preferentemente assimiladas pelos espermatozoides do que as menores (150-750 bp).

Entretanto, ao contrário do que se poderia supor, o sexo cromossômico não altera a capacidade do espermatozoide em se ligar ao eDNA, pois conforme Zaniboni et al. (2016), quando comparados espermatozoides X e Y, ambos têm a mesma habilidade neste quesito.

5.3.3. Métodos para aumentar a eficiência da SMGT

Embora os espermatozoides sejam espontaneamente capazes de captar DNA externos a si, pode-se lançar mão de métodos que otimizam este processo. Tais métodos podem ser físicos, como a eletroporação (EP), ou químicos, como a polifecção, que auxiliem o eDNA a internalizar o espermatozoide.

5.3.3.1. *Eletroporação*

A eletroporação (EP), também conhecida como eletroinjeção ou eletropermeabilização, é um método físico de transfecção celular amplamente utilizado. Para a EP, as células e o eDNA de interesse são colocados em um meio, onde então se aplica uma corrente elétrica, com potência e tempo suficientes para que o eDNA adentre a célula (PRAMOD et al., 2015). Esta corrente elétrica é de alta voltagem e muito curta duração. A EP faz com que poros se abram na membrana celular, mas, dependendo da voltagem e do tempo de aplicação da corrente elétrica, podem haver danos nas células.

Para garantir este sucesso são fundamentais algumas condições apropriadas. As principais são o meio utilizado para a eletroporação, o qual de ter em sua composição elementos que permitam a passagem da corrente elétrica para as células e que, ao mesmo tempo, mantenha a viabilidade espermática. Também, a recuperação da integridade da membrana plasmática após a eletroporação é essencial, o que demanda um meio e uma temperatura apropriados.

Outros fatores que devem ser estabelecidos estão diretamente ligados a corrente elétrica, sendo que estes variam de acordo com o tipo de aparelho utilizado. Estes são a intensidades da corrente elétrica, ou seja, a quantidade de volts utilizada, bem como o tempo de ação desta corrente sobre as células e ainda, o número de pulsos que a eletricidade incidirá sobre as células.

A combinação da EP com a SMGT é factível, entretanto, quando se trabalha com um tipo celular específico, como o espermatozoide, existem ainda outros entraves para o uso da EP. Uma eletroporação eficiente ou bem sucedida é aquela em que se aumenta a taxa de transfecção e consegue manter o espermatozoide vivo e apto a fecundação. Em espermatozoides, a intensidade da voltagem, bem como a quantidade de eDNA durante a EP, podem afetar a motilidade espermática reduzindo-a, além de diminuir as taxas de fertilização, nascimento, transferência gênica e anormalidades embrionárias

(TSAI, 2000). Além do mais, a morfologia e a composição bioquímica variam entre os espermatozoides das diversas espécies animais. Por isso, muitas vezes, não é possível compartilhar entre duas espécies, um mesmo protocolo já padronizado.

Tsai (2000) utilizou a EP em espermatozoides de Peixe (*Misgurnus anguillicaudatus*) e de molusco (*Haliothis diversicolor*), observando 56% de espermatozoides transfectados, enquanto que no grupo controle não se observou transfecção. Este autor também constatou diminuição da motilidade quando utilizada voltagem superior a 8 kv e ausência completa de motilidade quando utilizado 10 kv. Vários trabalhos utilizando EP, com diversos protocolos e taxas de sucesso, foram produzidos com espermatozoides bovinos (GAGNÉ; POTHIER; SIRARD, 1991; RIETH; POTHIER; SIRARD, 2000; SIMÕES et al., 2015) e caprinos (PRAMOD et al., 2015), porém há escassez de trabalhos que empregam a EP em espermatozoides suíno. Apenas Horan et al. (1992), utilizaram tal metodologia, obtendo de 5-10% de incremento na transfecção comparado com o grupo controle. Neste trabalho obteve tal resultado utilizando uma alta voltagem (nº de volts não especificado), aplicada por 2,4 segundo. Em se tratando de eletroporação de espermatozoide, a técnica se encontra mais desenvolvida em bovinos, sabendo-se muito pouco sobre a mesma em espermatozoides suínos.

5.3.3.2. Polifecção

Os polímeros nanoestruturados são uma tecnologia moderna e com aplicação em diversos campos da ciência biomédica. Existem vários polímeros disponíveis no mercado, cada um apropriado a uma ou mais finalidades, sendo alguns destes destinados a transfecção celular. A transfecção por este método é conhecida como polifecção. A polifecção é um método não viral de transfecção de células, que usa polímeros catiônicos como veiculadores de eDNA (FISCHER, 1999). Estes polímeros e o eDNA se unem formando um complexo denominado poliplexo. Este poliplexo interage eletricamente com a membrana celular, facilitando a entrada do eDNA na célula (ILARDUYA; SUN; DÜZGÜNES, 2010).

A polietilenoimina, ou PEI, é um polímero catiônico que devido a sua carga positiva, se liga ao DNA, por este possuir carga negativa, formando complexos PEIDNA. (BIEBER et al., 2002). Esta propriedade é explorada para a entrega de eDNA no interior das células. Complexos PEI-DNA ligam-se a superfície celular e são

internalizadas por endocitose. Dentro das células estes complexos migram para núcleo, onde o DNA é liberado (GODBEY et al., 1999). Outros pontos favoráveis ao uso da PEI são a pouca citotoxicidade para grande parte das células e principalmente, o tropismo ao núcleo. A PEI consegue, então, ligar-se a e transportar moléculas de DNA para o interior das células, entregando-as no núcleo celular. Estas são propriedades que a tornam de muita valia na transfecção celular.

A polietilenoimina é utilizada na transfecção de diversos tipos celulares. Dang, et al. (2011) transfectaram células CHO (células ovarianas de hamster chinês), HEK 293T (células renais embrionárias) e células COS (células originadas de CV1 que suportam SV40) de macacos. Hsu e Uludag (2012) lançaram mão desta metodologia para transfecção de fibroblastos prepucciais humanos normais (CRL2522) e células estromais de osso marrom de humanos e ratos.

Em espermatozoides suínos, nanopartículas magnéticas revestidas com PEI, comercialmente disponível como Polymag-1000® (Chemicell, Alemanha), foi testada por Fang et al. (2017). Estes autores conseguiram obter suínos transgênicos para o gene PID1 (Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1), com 29,16% de eficiência. No entanto, a PEI sem associações nunca foi testada em espermatozoides de nenhuma espécie animal.

Alguns parâmetros devem ser observados para que a PEI seja utilizada de forma obter níveis satisfatórios de transfecção. Deve-se estabelecer qual a concentração de PEI é a mais adequada, além de qual o tempo de incubação necessário para a este polímero ultrapassar a membrana citoplasmática do espermatozoide.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. ANIMAIS E PROTOCOLO DE BIOÉTICA

Utilizou-se, em cada experimento, doses comerciais de sêmen de 10 machos suínos (*Sus scrofa domesticus*), em idade reprodutiva (entre 1 e 5 anos), das linhagens

comerciais AGPIC 337 (Agroceres Pic), NK 75 (Choice Genetics), LI 7600 SUPREMO (DB Genética Suína) e MS 115 (Embrapa), oriundas da central de sêmen da Associação Catarinense dos Criadores de Suínos (ACCS). Estas foram inicialmente avaliadas quanto à motilidade e concentração espermáticas, diluídas em BTS® (Beltsville Tawing Solution) para obtenção de amostras como concentração de 2×10^6 sptz/mL e preservados entre 16 e 18 °C até a realização dos experimentos.

O presente estudo, por utilizar apenas sêmen disponível comercialmente, não envolvendo o diretamente o uso de animais, foi dispensado de julgamento pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Suínos e Aves (CEUA/CNPSA).

6.2. AVALIAÇÕES SEMINAIS

6.2.1. Motilidade

Para a avaliação da motilidade espermática, retirou-se, de cada dose de sêmen, uma alíquota de aproximadamente 1 mL, que foi colocada em um tubo de ensaio de vidro e aquecido a 37 °C, em banho seco. Após alcançar esta temperatura, retirou-se de 5 a 10 μ L de sêmen, que foram colocados em lâmina de vidro e cobertas por lamínula também, ambas pré-aquecidas a 37°C. Em seguida, levou-se ao microscópio de contraste de fase, em aumento de 100x e então, subjetivamente, estimou-se a porcentagem de espermatozoides moveis (FONSECA, 1992).

6.2.2. Concentração

Para a avaliação da concentração espermática, utilizou-se a contagem das células na câmara de Neubauer. Para isso, retirou-se, de cada dose de sêmen, uma alíquota de 10 μ L, que foi diluída na proporção de 1:10 em solução de formol-citrato. Montou-se a câmara de Neubauer e, após homogeneização por pipetagens sucessivas, pipetou-se 10 μ L e preencheu-se uma das câmaras. Levou-se ao microscópio de contraste de fase em aumento de 200x. Procedeu-se a contagem do número de espermatozoides em cinco dos quadrados maiores de cada lado da câmara. Calculou-se então a concentração de espermatozoides por mL, utilizando-se a seguinte fórmula: média da contagem das duas câmaras $\times 5 \times 10 \times 10 \times 1000 = n^\circ$ de sptz/mL (FONSECA, 1992).

6.2.3. Citometria de fluxo

Para as análises por citometria de fluxo, utilizou-se o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (Becton & Dickison, Santiago, Chile), o qual possui como fonte de excitação, feixe de laser de 488 nm. Este aparelho é equipado com três filtros de fluorescência (FL-1, FL-2 e FL-3) que captam diferentes comprimentos de luz (533 ± 30 , 585 ± 40 e 675 ± 25 nm, respectivamente). Além disso, há outros dois detectores que fornecem informações sobre o tamanho (FSC) e complexidade (SSCA).

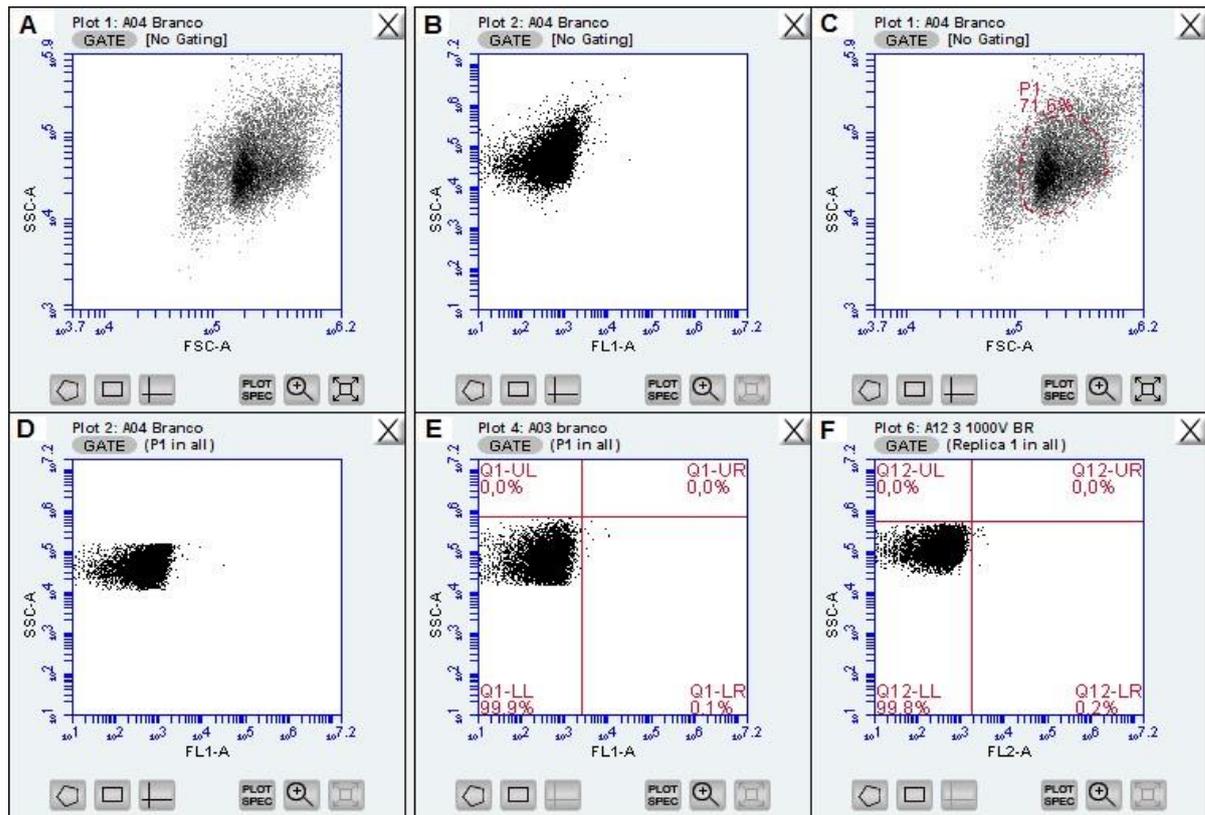
Conforme cada célula passa pelo laser, gera-se um sinal luminoso, que é captado pelos filtros de luz do aparelho, de acordo com o comprimento de onda emitido e então, são gerados pelo *software* BD CSampler Software dois gráficos de pontos, nos quais é realizada a análise da amostra. No primeiro gráfico, as células são agrupadas conforme seu tamanho e complexidade (figura 3A). Já no segundo, as células são separadas conforme a intensidade luminosa detectada pelos filtros de fluorescência (figura 3B).

Inicialmente, em cada uma das avaliações realizadas e para cada uma das replicatas, uma amostra controle (branco), ou seja, que não foi empregada as sondas, foi lida pelo citômetro de fluxo, para se estabelecer os parâmetros iniciais. No branco, conforme demonstrado na figura 3C, utilizando o primeiro gráfico, é realizada o “gate” da amostra, ou seja, a seleção da população que representa os espermatozoides, que deve ficar em torno de 80% da amostra, desta forma sendo retirados da avaliação artefatos como grumos, sujidades e outros tipos celulares que não os de interesse.

Este gate é aplicado sobre o segundo gráfico (figura 3D).

Neste segundo gráfico então, são selecionadas as células não marcadas com as sondas pelo uso de retas paralelas ao eixo X e Y que originaram o quadrante inferior esquerdo, correspondendo aos espermatozoides sem fluorescência. Já o quadrante inferior direito (e o superior esquerdo, no caso das sondas JC-1 e laranja de acridina) corresponde, no branco, aos espermatozoides que emitem autofluorescência, que não deve ultrapassar a 0,3% da amostra (figuras 3E e 3F).

Figura 03 - Leitura e análise do branco na citometria de fluxo



A) primeiro gráfico, células agrupadas por tamanho e complexidade, sem gate; **B)** segundo gráfico, células classificadas pelo comprimento de onda emitido, sem gate; **C)** seleção do gate da amostra; **D)** aplicação do gate no segundo gráfico; **E)** delimitação dos quadrantes com células com e sem emissão de fluorescência para FL-1; **F)** delimitação dos quadrantes com e sem emissão de fluorescência para FL-2. Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

Após a leitura dos brancos, são lidas as amostras tratadas com as respectivas sondas. Cada sonda utilizada, quando excitada pelo laser, emite sinais luminosos de um ou mais comprimentos de onda específico, que são captados pelos seus respectivos filtros no aparelho. Estes sinais são convertidos em gráficos de pontos, gerados pelo *software*, conforme descrito anteriormente. A análise destes gráficos utiliza metodologias específicas para cada sonda, que serão descritas posteriormente.

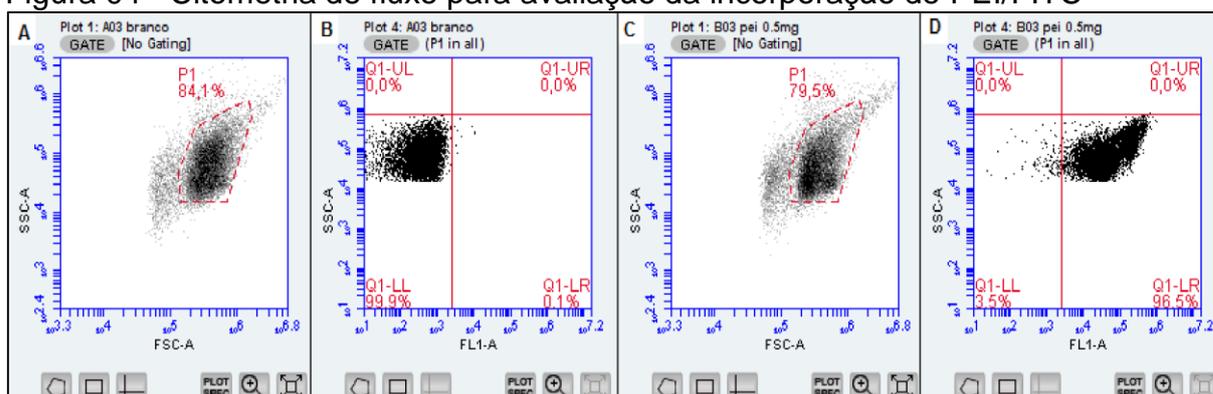
6.2.3.1. Avaliação da incorporação da PEI

Para se conhecer a porcentagem de espermatozoide que conseguiram incorporar a PEI, após a incubação com PEI/FITC, as amostras foram avaliadas através de citometria de fluxo. Inicialmente, para cada uma das amostras, analisou-se primeiro o branco, conforme descrito no item 6.2.3 (figuras 4A e 4B).

Em seguida, analisou-se as amostras tratadas. O Isotiocianato de fluoresceína (FITC), utilizada como molécula repórter, quando excitada pelo laser, emite luz fluorescente com ondas de aproximadamente, 525 nm, a qual é medida por FL-1 (figura 4C). O eixo Y representa, em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides que incorporaram a PEI/FITC. O eixo X representa, em Log, a intensidade de luminosidade que indica o tamanho dos espermatozoides.

Estas intensidades foram usadas como origem de retas paralelas ao eixo X e Y, que originaram o quadrante inferior esquerdo, correspondendo aos espermatozoides que não incorporaram a PEI/FITC e o quadrante inferior direito, que corresponde aos espermatozoides que incorporaram a PEI/FITC. A análise dos dados da citometria de fluxo para PI está representada na figura 4D.

Figura 04 - Citometria de fluxo para avaliação da incorporação de PEI/FITC



A) seleção da população padrão da amostra; **B)** quadrante inferior esquerdo, indicando a população padrão da amostra; **C)** seleção da população da amostra transfectada com PEI/FITC; **D)** quadrante inferior esquerdo, indicando a percentagem da população não transfectadas e quadrante inferior direito, indicando a percentagem da população transfectada com PEI/FITC. Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

6.2.3.2. Avaliação da incorporação de Iodeto de Propídio por espermatozoides submetidos a eletroporação

O Iodeto de Propídio (PI) é uma substância que, quando excitada por laser, emite luz fluorescente com ondas de aproximadamente, 617 nm. A membrana celular, quando íntegra, é impermeável ao PI, porém, quando lesionada ou por ocasião da abertura de

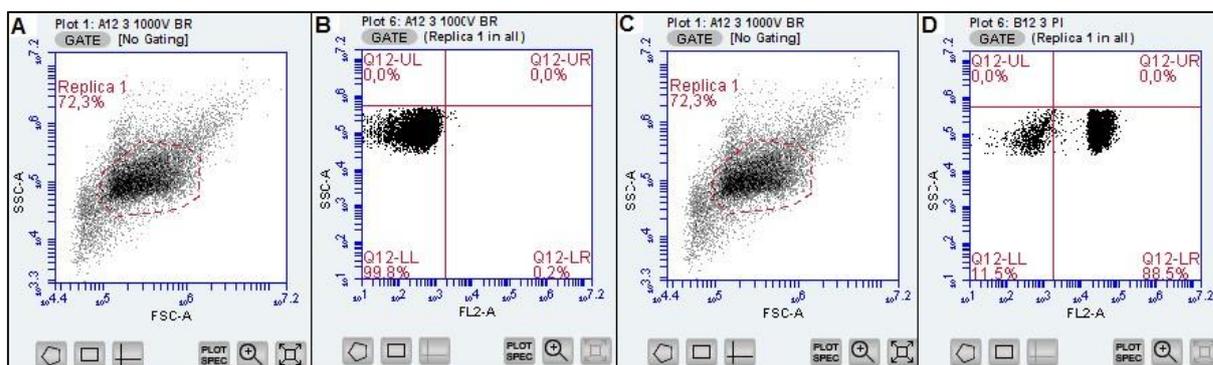
poros na eletroporação, moléculas de PI ultrapassam a membrana citoplasmática, adentram a célula e se ligam aos ácidos nucleicos.

Por estas características, o PI neste estudo, foi utilizado com duas finalidades. Inicialmente como molécula repórter, permitindo aferir a porcentagem de células em que a eletroporação era suficiente para permeabilizar a membrana. Em uma segunda ocasião, utilizou-se o PI como sonda, a fim de diagnosticar o número de células com membrana citoplasmática lesionada. Em ambos os casos, a mensuração da taxa de incorporação de PI, deu-se por citometria de fluxo, utilizando o mesmo método de análise.

Para a avaliação da incorporação de PI pelos espermatozoides submetidos à eletroporação, inicialmente, para cada uma das amostras, analisou-se o branco, conforme descrito no item 6.2.3. Após, foram lidas as amostras tratadas, de acordo com o grupo experimental, conforme descritos nos respectivos experimentos 3 (item 6.4.1) e 4 (item 6.4.2). A fluorescência do PI é captada pelo FL-2.

Após a leitura de cada amostra, é gerado pelo *software* BD Csmpler Software um gráfico de pontos. O eixo Y representa, em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides com alteração da permeabilidade de membrana seletiva ao PI. O eixo X representa, em Log, a intensidade de luminosidade que indica o tamanho dos espermatozoides. Estas intensidades foram usadas como origem de retas paralelas ao eixo X e Y, que originaram o quadrante inferior esquerdo, correspondendo aos espermatozoides que não incorporaram PI e o quadrante inferior direito, que corresponde aos espermatozoides que incorporaram PI, conforme representado na figura 05.

Figura 05 – Citometria de fluxo na avaliação da incorporação de Iodeto de Propídio



a) seleção da população espermática padrão da amostra; b) quadrante inferior esquerdo, indicando a população padrão da amostra; c) seleção da população espermática da amostra corada com PI; d) quadrante inferior esquerdo, indicando a percentagem da população com membrana íntegra e quadrante inferior direito, indicando a percentagem da população com membrana íntegra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

6.2.3.3. Sondas para avaliação da viabilidade espermática

6.2.3.3.1. Integridade de Acrossoma

Para a análise da integridade acrossomal (IA), utilizou a sonda FITC-PSA (Lectin from *Pisum sativum* (pea) FITC conjugate¹, Sigma). O acrossoma é impermeável ao FITC-PSA, assim sendo, apenas espermatozoides com acrossoma lesionado serão corados com esta sonda. Inicialmente, para cada uma das replicatas, leu-se uma amostra branca, conforme descrito no item 6.2.3. Após isso, foram analisadas as amostras tratadas. Para isso, após cada tratamento experimental retirou-se uma alíquota de 50 μL de cada amostra e incubou-se com FITC-PSA (1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 10 minutos, a 37°C. Em seguida, adicionou-se 50 μL de BTS, a 37 °C, levou-se as amostras avaliadas por citometria. A análise dos dados foi realizada conforme descrito no item 6.2.3.1. O resultado da análise da integridade acrossomal é expresso na percentagem de espermatozoides com lesão acrossomal (LA).

6.2.3.3.2. Integridade de Membrana Citoplasmática

¹ N° de catalogo L0770

Para a análise da integridade da membrana citoplasmática (IMC), utilizou-se a sonda PI (Propidium Iodide², Sigma). O PI é uma substância impermeável a membrana citoplasmática intacta, portanto apenas espermatozoides com membrana citoplasmática lesionada serão corados. Inicialmente, para cada uma das replicatas, leu-se uma amostra branco, conforme descrito no item 6.2.3. Após isso, foram analisadas as amostras tratadas. Para tanto, após cada tratamento experimental retirou-se uma alíquota de 50 µL de cada amostra e incubou-se com PI (10 µg/mL), por 10 minutos, a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 50 µL de BTS, a 37 °C, sendo as amostras avaliadas por citometria. A análise dos dados foi realizada conforme descrito no item 6.2.3.1. O resultado da análise da integridade membrana citoplasmática é expresso na porcentagem de espermatozoides com lesão membrana citoplasmática (LMC).

6.2.3.3.3. Integridade de Cromatina

Para a análise da integridade da cromatina (IC), utilizou-se a sonda laranja de acridina (AO, Acridine Orange³, Sigma). A sonda AO é permeável a membrana citoplasmática e se intercala aos ácidos nucleicos de dupla hélice e quando excitadas emitem fluorescências com comprimento de onda de 530 nm (fluorescência verde), a qual é medida pelo filtro 1 (FL-1) do aparelho. Já, em ácidos nucleicos de fita simples o AO se liga eletrostaticamente ao grupo fosfato e quando excitado emite fluorescência com comprimento de onda de 640 nm (fluorescência vermelha), a qual é medida pelo filtro 2 (FL-2) do aparelho.

Por estas características, a utilização desta sonda permite detectar, separadamente, em uma amostra, a quantidade de ácidos nucleicos com fita simples ou dupla. Devido à ausência ou baixa quantidade de RNAs em espermatozoides, pode-se considerar que a quantidade de fluorescência vermelha detectada corresponde apenas a DNA de fita simples, ou seja, moléculas de DNA não integro. Inicialmente, para cada uma das replicatas, leu-se uma amostra branco, conforme descrito no item 3.2.3. Após isso, foram analisadas as amostras tratadas. Para tanto, após cada tratamento experimental, retirou-se uma alíquota de 125 µL de cada amostra, a qual foi

² N° de catalogo P4170

³ N° de catalogo A6014

centrifugada a 1100 RFC, por 4 minutos, retirado o sobrenadante, adicionado 80 µL de detergente ácido, incubado por 30 segundos, adicionado 125 µL de AO e incubado por 3 minutos. Em seguida as amostras foram avaliadas por citometria. .

Após a leitura de cada amostra, é gerado pelo software BD Csmpler Software um gráfico de pontos. O eixo Y representa, em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides com DNA não íntegro, marcados com AO e emitindo fluorescência vermelha (640 nm), medida pelo FL-2. O eixo X representa, também em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides com DNA íntegro, marcados com AO e emitindo fluorescência verde (530 nm), medida por FL-1. A interpretação dos dados seguiu o descrito por Wakefield *et al.* (2010). O resultado da análise da integridade membrana citoplasmática é expresso na porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado (fDNA).

6.2.3.3.4. Potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM), utilizou-se a sonda JC-1 (JC-1⁴, Sigma-Aldrich). O PMM refere-se ao potencial elétrico das membranas, que é alto quando grandes quantidades de íons cloro (Cl) e sódio (Na) estão disponíveis externamente a membrana. Ou seja, quando estes íons estão disponíveis e em quantidade suficiente, a membrana está polarizada ou seja, o potencial de membrana está alto. Por outro lado, quando estes íons estão em baixa quantidade, a membrana está despolarizada, ou seja, há um baixo potencial de membrana. Este potencial de membrana em mitocôndrias, implica na quantidade de energia que esta organela gerará, sendo que quanto maior o potencial de membrana maior a capacidade de geração de energia para a manutenção da atividade celular. A sonda JC-1 é permeável à membrana citoplasmática e se liga a membrana mitocondrial. Quando ligado às membranas mitocondriais com alto potencial, formam-se J-agregados, emitindo fluorescência vermelha (596 nm) que é detectada em FL-2 do aparelho. Já, quando membranas possuem baixo potencial, ligam monômeros de JC-1 e pode ser observada fluorescência de coloração verde, com comprimento de luz de 520 nm, que é captada pelo FL-1.

⁴ N° de catálogo T4069

A taxa de cada coloração observada depende exclusivamente do potencial da membrana, não sendo influenciada pelo tamanho, forma ou número de mitocôndrias. Por estas características, a utilização desta sonda permite detectar, separadamente, em uma amostra, a quantidade de mitocôndrias com baixo ou alto potencial de membrana.

Porém, para se conhecer a taxa de células com baixo PMM, previamente, utiliza-se o CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone⁵, Sigma-Aldrich), o qual é um protonóforo (H^+ ionóforo) e desacoplador de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Com isso, inibe parcialmente a absorção de Cl^- ativado por gradiente de pH e as atividades de troca Cl^- / Cl^- , despolarizando a membrana mitocondrial, ou seja, reduzindo o potencial de ação das membranas. Com o uso de CCCP, então, mais de 90% das células da amostra ficam com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Este produto é utilizado na citometria para indicar onde estarão as células com baixo PMM em uma amostra.

Inicialmente, para cada uma das replicatas, leu-se uma amostra branco, conforme descrito no item 6.2.3. Após isso, para cada uma das amostras transfectadas, retirou-se uma alíquota de 100 μL , incubou-se com 1 $\mu g/mL$ de CCCP, incubou-se por 5 minutos, adicionou-se 10 $\mu g/mL$ de JC-1 e incubou-se por 10 minutos à 37°C. Em seguida, levou-se as amostras ao aparelho e estas foram analisadas. Após isso, foram analisadas as amostras tratadas. Para tanto, após cada tratamento experimental, retirou-se uma alíquota de 100 μL de cada amostra, adicionou-se JC-1 (10 $\mu g/mL$) e incubou-se por 10 minutos à 37°C. Em seguida, levou-se as amostras ao aparelho e estas foram analisadas. Após a leitura de cada amostra, é gerado pelo software BD Csampller Software um gráfico de pontos. O eixo Y representa, em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides com mitocôndrias com alto potencial de membrana detectado por FL-2. O eixo X representa, em Log, a intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides com mitocôndrias com baixo potencial de membrana, detectado por FL-1.

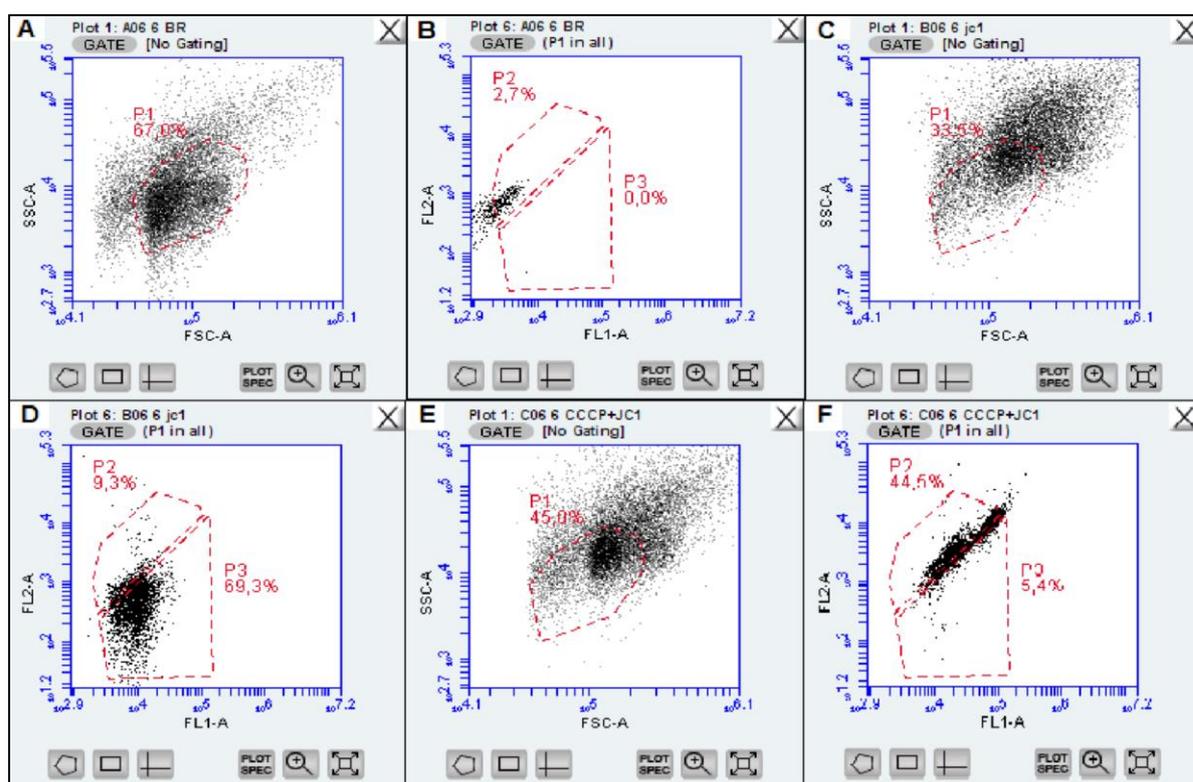
Para a análise dos gráficos, na amostra não corada, faz-se o “gate” (seleção) da população normal de espermatozoide. Este *gate* é chamado de P1 (figura 6A). Aplica-se então o *gate* P1 sobre as amostras com CCCP+JC-1 e faz-se um segundo *gate* nesta segunda amostra, que será chamado de P2. Imediatamente abaixo de P2,

⁵ N° de catálogo C2759

desenha-se um terceiro *gate* (P3) (figura 6B). Então, faz-se a compensação de coloração, corrigindo FL-2, subtraindo aproximadamente 12 a 15% do conteúdo de FL-1, com isso os espermatozoides com baixo potencial de membrana, marcados pelo CCCP, serão movidos de P2 para P3 (figura 6D). Quando restar em P2, no máximo 10% da amostra, aplica-se a compensação previamente estabelecida.

Estes passos, utilizando-se a amostra CCCP+JC-1, são utilizados para identificar, no gráfico, onde deverão estar as células que realmente estão com baixo potencial mitocondrial. Após isso, clica-se sobre as amostras tratadas com JC-1 e em P3 estará a porcentagem de células com baixo PMM (figura 6F). O resultado da análise do potencial de membrana mitocondrial é expresso na porcentagem de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial (bPMM).

Figura 06 – Citometria de fluxo para análise do potencial de membrana mitocondrial



A) seleção da população normal; B) população normal nos filtros no gráfico FL1xFL2; C) seleção da população CCCP+JC-1; D) população CCCP+JC-1 em P3; E) seleção da população JC-1; F) população JC-1 em P2, alto PMM e em P3, baixo PMM. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6.3. ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA POLIFECÇÃO DE ESPERMATOZOÍDES SUÍNOS UTILIZANDO PEI

Para os experimentos de polifecção com polietileimina, utilizou-se a PEI ramificada, com peso molecular de 25000 daltons, (Polyethylenimine⁶, Sigma Aldrich).

6.3.1. Experimento 1. Determinação da concentração e tempo de incubação da PEI utilizando PEI/FITC

Para se conhecer a quantidade de PEI que espermatozoides suínos são capazes de incorporar, optou-se por conjugá-la a uma molécula repórter, que emitisse fluorescência. Assim, após a incubação, as amostras seriam submetidas a citometria de fluxo, técnica que possibilita a análise de um grande número de células e a quantificação das células marcadas.

A escolha da molécula repórter levou em consideração a habilidade desta em ser impermeável à membrana citoplasmática intacta e que pudesse ser analisada pelo equipamento de citometria de fluxo disponível no laboratório. A molécula de escolha foi o FITC.

A conjugação da PEI com o FITC foi realizada semelhante ao descrito por Saito e Saitoh (2012) com modificações. Esta etapa é realizada em três dias. No primeiro dia é preparada uma solução PEI a 20 mg/mL em PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*), que, após o preparo, deve ser mantida sob refrigeração até o segundo dia. No segundo dia, adiciona-se o FITC a solução de PEI de modo a se obter uma concentração final de 1 mM de FITC.. Após isso, é feita a remoção das moléculas de FITC não ligadas à PEI por diálise contra PBS por 24 h. No terceiro dia, o saco de diálise contendo a PEI/FITC é retirado do meio, o seu volume é mensurado e a concentração de PEI/FITC é ajustada (concentração final estimada: 18,5mg/mL).

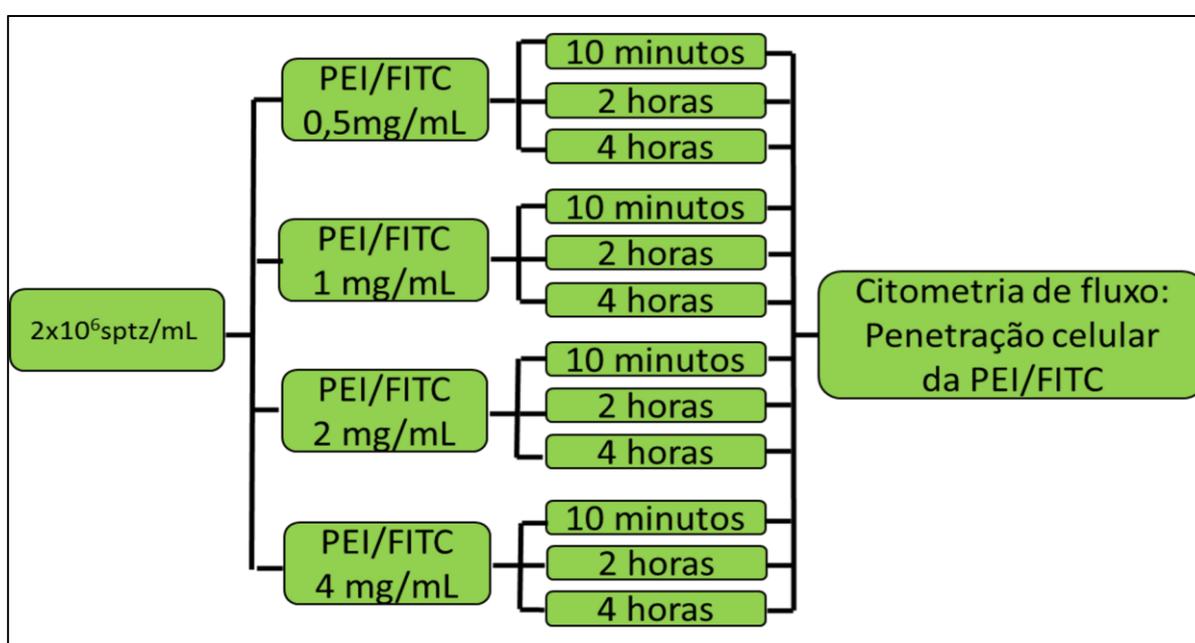
Após a obtenção da PEI/FITC, procurou-se otimizar o protocolo para transfecção de espermatozoides suínos utilizando a PEI, através da determinação da concentração ideal e do tempo adequado de incubação de PEI com espermatozoides. Por não haver trabalhos relatando o uso da PEI em espermatozoides, foram utilizadas concentrações e tempos semelhante ao utilizado por Hsu e Uludag (2012), para a transfecção de fibroblastos.

⁶ N° de catálogo 408727

Utilizaram-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS para obtenção de amostras com 200 μ L e 2×10^6 spzt/mL.

Foram testadas quatro diferentes concentrações, sendo 0,5 (C1), 1 (C2), 2 (C3) ou 4 (C4) mg/mL de PEI/FITC, incubando-se durante 10 minutos, 2 horas (2H) e 4 horas (4H), conforme apresentado na figura 07. Após as incubações, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo, conforme descrito no item 6.2.3.1.

Figura 07 - Representação esquemática do delineamento do experimento 1



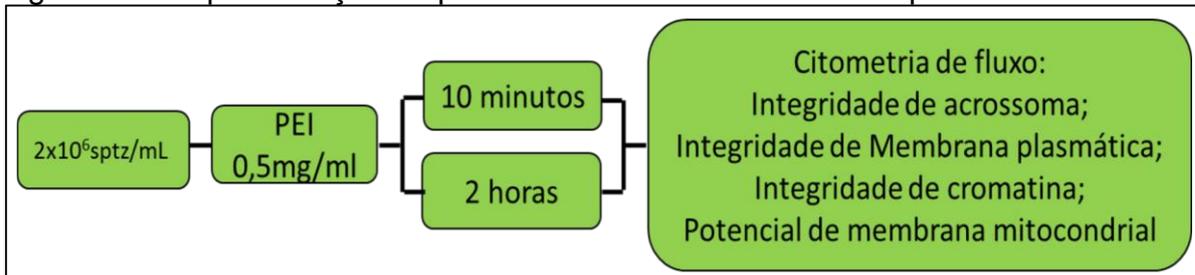
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6.3.2. Experimento 2. Efeito da Polietilenoimina na viabilidade espermática de espermatozoides suínos

Neste experimento, conforme definido no experimento 1, utilizou-se a concentração de PEI de 0,5 mg/mL e os tempos de incubação de 10 minutos e 2 horas, conforme ilustrado na figura 08. Após a incubação dos grupos experimentais com PEI, estes foram analisados por citometria de fluxo, empregando-se sondas fluorescentes, para determinar os danos celulares que a PEI pode provocar em espermatozoides. As sondas utilizadas foram FITC-PSA, PI, AO e JC-1, as quais são utilizadas para avaliar, respectivamente, a integridade de membrana, de acrossoma e da cromatina e o potencial de membrana mitocondrial, conforme descrito no item

6.2.3.3.

Figura 08 - Representação esquemática do delineamento do experimento 2



6.4. OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS UTILIZANDO ELETROPORAÇÃO

As eletroporações foram realizadas utilizando amostras de sêmen de 200 μL , numa concentração 2×10^6 spz/mL, utilizando-se cuvetas Eppendorf de 2 mm (400 μL de capacidade), no aparelho Multiporator® (Eppendorf AG. Hamburg - Germany).

6.4.1. Experimento 3. Otimização do meio e da temperatura para a recuperação espermática pós eletroporação

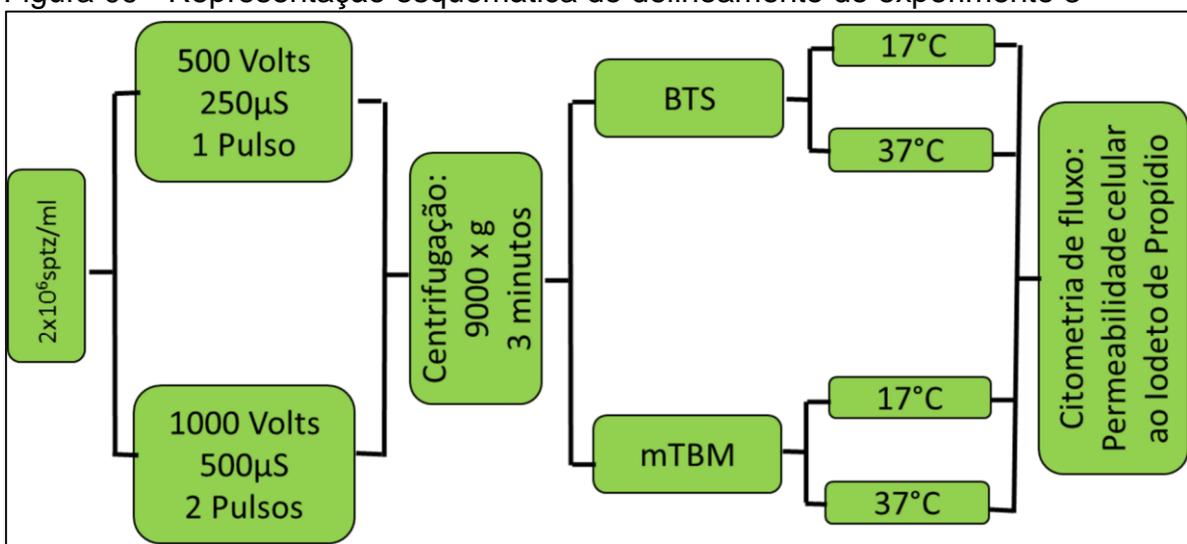
Diante do fato que a eletroporação causa poros temporários nas membranas celulares e que após o encerramento dos pulsos elétricos a membrana deve ter condições de retornar a sua estrutura inicial, neste experimento procurou-se estabelecer o melhor meio e a melhor temperatura para a recuperação da integridade da membrana plasmática (RIMP) dos espermatozoides após a eletroporação.

Para isso após a EP em duas diferentes condições: 500 volts, 250 μs e 1 pulso (EP1) ou 1000 volts, 500 μs e 2 pulsos (EP2), as amostras foram recuperadas em quatro diferentes condições: mTBM (modified Tyrodes Buffered Medium) a 17 °C ou a 37 °C, ou BTS a 17 °C ou a 37 °C. O iodeto de propídio (PI), corante impermeável à membrana foi utilizado como molécula repórter. Cada amostra foi eletroporada usando BTS, a temperatura ambiente (22 °C). Após a eletroporação, centrifugou-se as amostras a 9000 x RCF por 3 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL de BTS ou mTBM e incubou-se por 30 minutos a 17 °C ou 37 °C, conforme seu respectivo grupo experimental, apresentado na figura 09.

Após as eletroporações e os tratamentos de recuperação, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, avaliando-se a taxa de incorporação de PI em três momentos: antes da EP (PI0), logo após a EP (PI1) e 30 minutos após a recuperação (PI2). Primeiramente, para cada uma das replicatas, leu-se o branco, conforme descrito no item 6.2.3. A análise dos dados da citometria para a incorporação de PI ocorreu conforme descrito no item 6.2.3.2.

Os dados obtidos na citometria de fluxo foram utilizados para o cálculo da RIMP. A taxa de RIMP se deu pela fórmula $RIMP = (PI2-PI0) - (PI1-PI0)$, que representa a taxa de incorporação de PI após as incubações para recuperação da membrana excluído a marcação por PI como sonda antes da incubação. Para a interpretação do resultado do cálculo, deve ser considerado que quanto menor o valor, melhor a RIMP, pois quanto menor a incorporação de PI, mais íntegra encontrava a membrana plasmática. Submeteu-se, então, os valores encontrados de RIMP à análise estatística.

Figura 09 - Representação esquemática do delineamento do experimento 3



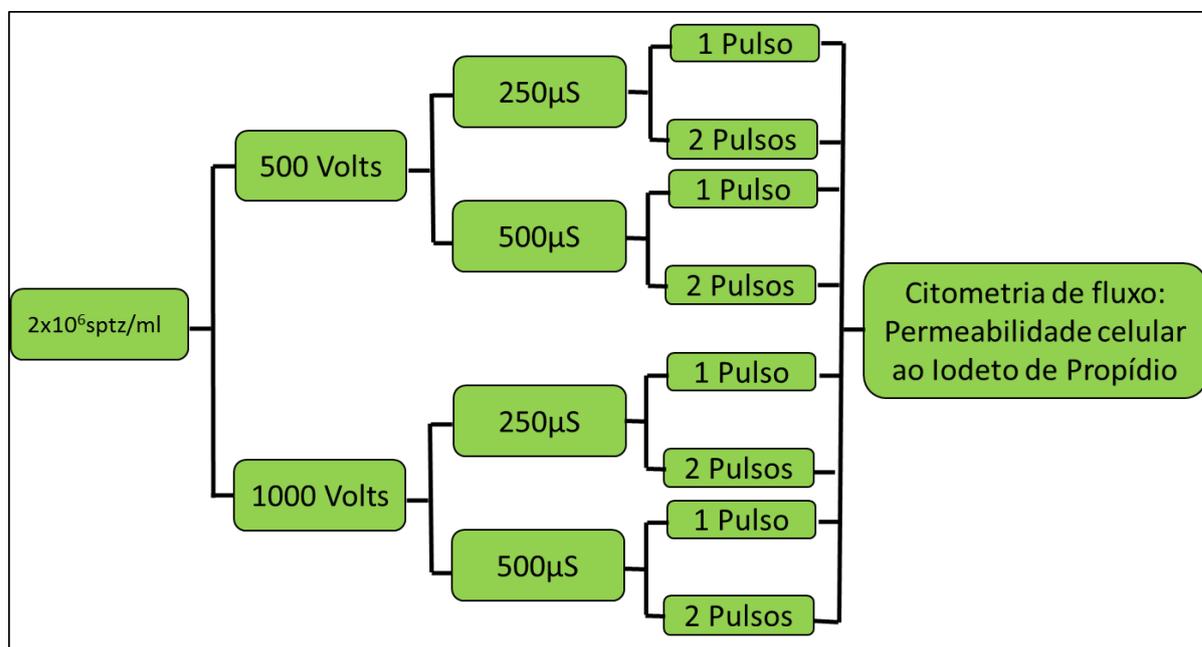
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6.4.2. Experimento 4. Determinação da voltagem, número de pulsos e tempo para eletroporação de espermatozoide suínos

Após o estabelecimento do meio e da temperatura a serem utilizados na eletroporação, neste experimento procurou-se estabelecer qual o melhor protocolo a ser utilizado para a eletroporação de espermatozoides suínos. Foram testadas duas voltagens (500 ou 1000 volts) em um pulso único ou duplo, com duas durações de pulso (250 ou 500 μ s). Para isso, amostras de 200 μ L sêmen de 2×10^6 spz/mL, incubadas com 10 μ g/mL de PI ou não (branco) foram eletroporadas de acordo com seu respectivo grupo experimental, conforme demonstrado na figura 10.

Após a eletroporação, conforme definido no experimento 3, item 6.4.1, as amostras foram incubadas em BTS a 17 °C, para a recuperação da membrana plasmática. Após a incubação, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, para a mensuração da incorporação de PI, conforme descrito no item 6.2.3.2. Os dados gerados foram submetidos à análise estatística, para a seleção dos dois grupos experimentais que apresentaram maior incorporação de PI, que serão utilizados no experimento 5.

Figura 10 - Representação esquemática do delineamento do experimento 4

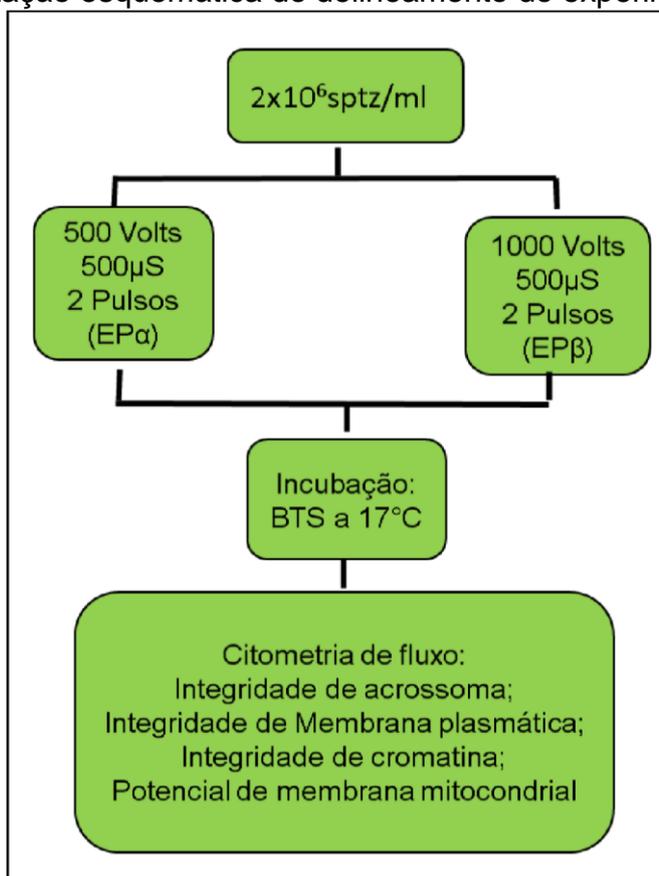


Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6.4.3. Experimento 5. Efeito da eletroporação na viabilidade espermática de espermatozoides suínos

Neste experimento, conforme definido no experimento 4, item 6.4.2, utilizou-se a 500 volts, 500 μ s, 2 pulsos ($EP\alpha$) e 1000 volts, 500 μ S e 2 pulsos ($EP\beta$), para a eletroporação. Após a EP, conforme definido no experimento 3, item 6.4.1, as amostras foram incubadas em BTS, à 17 °C, para a recuperação da membrana plasmática. Após a incubação, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. As sondas utilizadas foram FITC-PSA, PI, AO e JC-1, as quais são utilizadas para avaliar, respectivamente, a integridade de membrana, de acrossoma e da cromatina e o potencial de membrana mitocondrial, conforme descrito no item 6.2.3.3. O delineamento do experimento está representado na figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática do delineamento do experimento 5



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6.5. TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS UTILIZANDO-SE PEI E ELETROPORAÇÃO

6.5.1. Obtenção do vetor plasmídeo PiggyBac pmhyGENIE-5

O plasmídeo utilizado na transfecção dos espermatozoides foi o vetor com integração baseada em transposase PiggyBac, (pmhyGENIE-5), o qual contém a transposase hiperativa de piggyBac de mamífero e que codifica a proteína verde fluorescente melhorada (eGFP). O plasmídeo pmhyGENIE-5 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Stefan Moisyadi, da Universidade do Havaí (Honolulu, Havaí, EUA).

6.5.1.1. *Transformação Bacteriana*

Para a obtenção de maiores quantidades de plasmídeos, bactérias *E. coli* competentes (DH5 α ou DH10 β) foram transformadas com a construção obtida, conforme Esteves (2001) com modificações. Os clones foram selecionados pela presença do antibiótico canamicina no meio de cultura, referente ao marcador de resistência a este antibiótico contido no plasmídeo construído, o gene KAN(R).

As bactérias transformadas foram semeadas em ágar Luria-Bertani contendo canamicina e cultivadas por 18 a 24 horas. Então, selecionaram-se as colônias que apresentaram crescimento adequado. A transformação bacteriana foi verificada pela análise dos clones bacterianos através do Kit mini preparação plasmidial (miniprep) QIAprep (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme orientações do fabricante, seguida do sequenciamento dos insertos contidos nos plasmídeos purificados.

6.5.1.2. *Sequenciamento dos insertos*

Os insertos contidos nos plasmídeos e purificados com o miniprep foram sequenciados, utilizando primers específicos para os plasmídeos empregados. Estes se situam em regiões flangeadoras do cassete de clonagem, permitindo a checagem da existência e localização do inserto no plasmídeo. Para a reação de sequenciamento do inserto empregou-se o kit BigDye Terminator® (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit⁷, Applied Biosystems, Foster City, EUA) e sua purificação utilizando o kit BigDye Xterminator® (BigDye Xterminator® Purification Kit⁸, Applied Biosystems,

⁷ N° de catalogo: 4337455

⁸ N° de catalogo: 4376484

Foster City, EUA). O material foi então injetado no sequenciador ABI3130XL (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Após a corrida da eletroforese, as sequências obtidas foram verificadas quanto à sua qualidade utilizando-se o *software* Sequencing Analysis (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Aquelas que apresentarem boa qualidade foram analisadas e as de baixa qualidade foram refeitas.

6.5.1.3. *Análise das sequências obtidas*

As sequências obtidas com boa qualidade foram avaliadas através da ferramenta online de alinhamento de sequências BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool/ U.S. National Library of Medicine), presente no sítio eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os insertos confirmados como sendo os de interesse foram mantidos sob congelamento até o momento dos experimentos.

6.5.2. Experimento 6. Efeito da transfecção usando Polifecção, eletroporação e incubação na viabilidade de espermatozoides suínos

6.5.2.1. *Método da Polifecção*

Inicialmente, foi realizada a complexação da PEI com o plasmídeo pmhyGENIE5. Este processo, foi realizado semelhante ao descrito por Saito e Saitoh (2012). O processo realizou-se em dois dias. No dia anterior a transfecção (dia zero), a PEI foi diluída em PBS (pH 7,2), numa concentração de 20 mg/mL. A solução de PEI foi então mantida sob refrigeração, entre 4 e 8°C, até sua utilização. No dia da transfecção, foi adicionado à solução de PEI, 32 µg do plasmídeo/mL da solução, sendo a mistura incubada por 2,5 horas a 17 °C para que houvesse a complexação dos plasmídios com a PEI.

Para a transfecção, utilizou-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS, para a obtenção de amostras de 200 µL sêmen de 2×10^6 spz/mL. Após a diluição, adicionou-se a cada amostra 0,5 mg de PEI/plasmídeo (que corresponde a uma dose de 400 ng de plasmídeo/amostra) e

incubou-se por 10 minutos, à 17°C. Imediatamente após o término da incubação, as amostras foram avaliadas quanto à viabilidade espermática por citometria de fluxo, conforme descrito no item 6.2.3.3.

6.5.2.2. *Método da Eletroporação*

Para a transfecção dos espermatozoides por eletroporação, utilizaram-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS, para a obtenção de amostras de 200 µL sêmen de 2×10^6 spz/mL. As amostras foram colocadas nas cubetas, adicionou-se 400 ng do plasmídeo pmhyGENIE-5/mL de amostra, e seguiu-se a eletroporação, conforme estabelecido no experimento 6, item 6.5.2. (500 volts, 500 µs e 2 pulsos). Após a EP, as amostras foram incubadas a 17 °C por 30 minutos para recuperação da integridade da membrana plasmática. Imediatamente após o término da incubação, as amostras foram avaliadas quanto à viabilidade espermática por citometria de fluxo, conforme descrito no item 6.2.3.3.

6.5.2.3. *Método da Incubação (controle)*

Como método controle da transfecção, empregou-se o método da incubação, utilizando-se o protocolo descrito por Lavitrano et al. (1997). Para isso, utilizaram-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS, para a obtenção de amostras de 200 µL sêmen de 2×10^6 spz/mL. Após a diluição, as amostras foram lavadas para a remoção do IF-1, sendo centrifugadas a 800 x RCF, por 10 minutos, retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 200 µL de BTS. As amostras foram centrifugadas a 800 x RCF, por 10 minutos, retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 200 µL de BTS. Adicionou-se então 400 ng do plasmídeo pmhyGENIE-5 para cada 1×10^6 sptz e incubou-se por 2 horas a 17 °C. Imediatamente após o término da incubação, as amostras foram avaliadas quanto à viabilidade espermática por citometria de fluxo, conforme descrito no item 6.2.3.3.

6.5.3. Experimento 7. Comparação das técnicas da polifecção, eletroporação e incubação na transfecção de espermatozoides suínos

Após a transfecção por cada um dos métodos, conforme descrito no item 6.5.2, uma alíquota de aproximadamente 4×10^5 espermatozoides foi retirada de cada amostra para a realização da quantificação da captação do plasmídeo nos espermatozoides, através de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH). Para isso, será utilizado o protocolo descrito por Bou et al. (2014) com modificações.

Para a FISH, foram construídas sondas para o gene da proteína verde fluorescente melhorada (eGFP, do inglês, *enhanced green fluorescent protein*) do plasmídeo pmhyGENIE-5, a partir da sequência genômica do referido plasmídeo, fornecida pelo fabricante do material. Como controle, foram construídas sondas para o gene da região do Y para a determinação sexual (SRY, do inglês *sex-determining region Y*), a partir da sequência genômica depositada no banco genômico do National Center of Biotechnology Information (NCBI), disponível no sítio eletrônico: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/U49860.3?from=4546&to=5256&sat=4&sat_key=78588295&report=fasta.

As sondas para o gene SRY foram marcadas com o fluoróforo Cyanine 3 (Cy3), o qual possui uma emissão de 570 nm, emitindo fluorescência amarela. As sondas para o gene eGFP foram marcadas com Cyanine 5 (Cy5) o qual possui uma emissão de 670 nm, emitindo fluorescência vermelha. Ambas as sondas foram obtidas da Síntese Biotecnologia LTDA (Belo Horizonte, MG).

Após a transfecção, por cada um dos métodos, as amostras foram centrifugadas a 9100x RCF, por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o pellet restante foi ressuspendido em 50 μ L de solução de fixação (metanol: ácido acético 3:1). As amostras foram depositadas nas lâminas e, após a aderência, foram armazenadas a -20 °C por um período mínimo de 20 horas e máximo de 30 dias.

As lâminas foram descongeladas e lavadas por 10 minutos, a temperatura ambiente em PBS, pH7,2, acrescida de Tween 20 (Tween 20®, Vetec⁹). A seguir, as lâminas foram lavadas 2 vezes, por 30 minutos, em SSC 2X (solução salina cítrico). Seguiu-se a despolimerização da protamina, para a qual as amostras foram incubadas com uma solução de Tris-HCl 1M e ditiotretol (1,4-Ditiotretol, Ludwig Biotec) 20mM por 30 minutos a 37 °C. Após a despolimerização, as lâminas foram lavadas (2 vezes) por 15 minutos em SSC 2X a 37 °C para a remoção do excesso de DTT das amostras.

⁹ Código do produto: 1208

Estas foram desidratadas em série de etanol (70, 80, 90 e 100%) e secas ao ar por 3 minutos.

Para a hibridização, em cada amostra foram depositados 50 µL da solução de hibridização, a qual contém 2,5 ng de sonda para o gene plasmidial eGFP, 2,5 ng de sonda para o gene cromossômico SRY, SSC 6X, 45% de formamida (Formamide¹⁰, Sigma), 10% de sulfato de dextrano (Dextran Sulfate Sodium Salt *Leuconostoc spp.*¹¹, Sigma). Após terem recebido a solução de hibridização, as amostras foram contidas em câmara úmida e escura e colocadas em estufa a uma temperatura de 75 °C durante 10 minutos para a desnaturação das fitas de DNA, tanto cromossômico quanto plasmidial. Após a desnaturação, as amostras permaneceram na câmara úmida e escura e foram mantidas em estufa a 37 °C, *overnight*, para que ocorresse a hibridização das sondas com suas respectivas sequências.

Após hibridização, as amostras foram lavadas (2 vezes) durante 15 minutos numa solução contendo 4% de formamida e SSC 6X a 50°C para que as sondas que não hibridizaram fossem removidas das amostras. As amostras foram desidratadas em série de etanol (70, 80, 90 e 100%), secas ao ar, por três minutos. Sobre cada amostra, foi cintilada uma gota de anti-fade (Fluoroshield™ with DAPI¹², Sigma), o qual é acrescido do fluoróforo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), que servirá como contracoloração, marcando todo o núcleo espermático. Prosseguiu-se a montagem final da lâmina, pela sobreposição da amostra com lamínula de vidro. Após a adesão, as margens da lamínula foram coladas na lâmina com uma camada de esmalte.

Finalmente, a leitura das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência (Axio Observer A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha). Para cada amostra foram observadas 100 células, sendo determinadas quais possuíam ou não marcação para cada uma das sondas.

Para sonda SRY, marcada com Cy3, a leitura foi feita utilizando o filtro 20HE Rhod, do aparelho, o qual detecta fluorescências com comprimento de ondas de 567 a 647 nm de emissão. O fluoróforo Cy3 emite ondas de luz de 570 a 630 nm de comprimento. Para a sonda plasmidial, marcada com Cy5, a leitura foi realizada utilizando o filtro 64 mPlum, o qual detecta fluorescências com comprimento de ondas de 612 a 682 nm de excitação. O fluoróforo Cy5 emite ondas de luz de 670 a 730 nm

¹⁰ N° de catalogo: F9037

¹¹ N° de catalogo: D8906

¹² N° de catalogo: F6057

de comprimento. Para esta sonda, foi ainda observado o número de marcações para cada célula contabilizada como positivamente marcadas. Neste último caso, cada marcação encontrada nas células representa um plasmídeo internalizado. Quanto maior o número de plasmídeos internalizados, maior o número de marcações que deverá ser encontrada.

6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

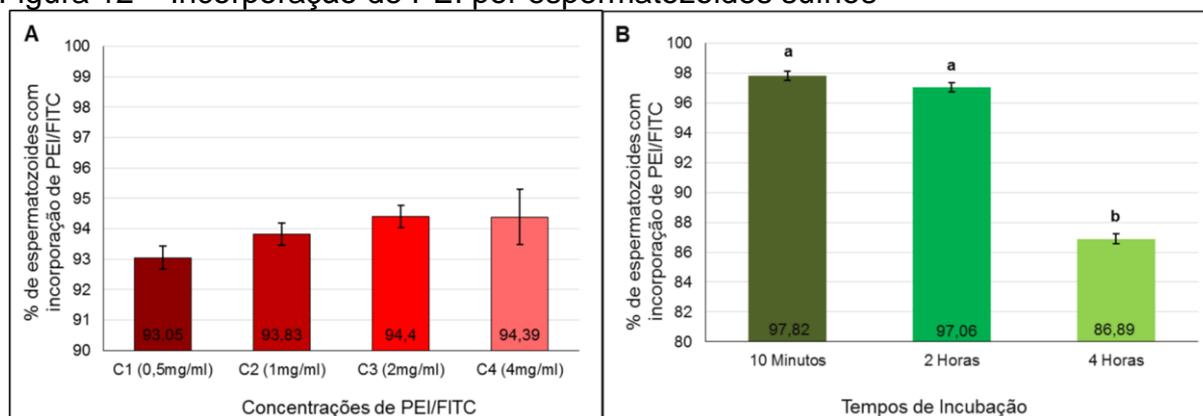
Os dados obtidos em cada um dos experimentos foram submetidos a análise estatística utilizando-se o PROC MIXED do programa computacional SAS 9.2® (Statistical Analysis System, SAS Institute Incorporation, Cary, NC, USA) para Windows. Foi utilizado o LSMEANS (média dos quadrados mínimos) para obtenção das médias ajustadas dos tratamentos, com comparações utilizando-se o Teste Tukey. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$) considerou-se que ocorreram diferenças entre as variáveis analisadas ou interação entre estas variáveis.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. EXPERIMENTO 1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE INCUBAÇÃO DA PEI UTILIZANDO PEI/FITC

Não houve interação entre a concentração e o tempo de incubação da PEI/FITC ($p=0.7317$). Os resultados para estes parâmetros estão representados nos gráficos da figura 12. Quanto a concentração, não houve diferença entre os grupos (Figura 12A), sendo as taxas de incorporação de PEI/FITC foram de $93.05\pm 0.37\%$ para o grupo C1, 93.83 ± 0.37 para C2, 94.40 ± 0.37 para C3 e $94.39\pm 0,9\%$ para C4. Quanto ao tempo de incubação, houve diferença entre os grupos ($p<.0001$) (Figura 12-B). O grupo 10 minutos teve uma taxa de incorporação de PEI/FITC de $97.82\pm 0,32\%$, não diferindo do grupo 2H ($97.06\pm 0,32\%$) ($p=0,4491$), mas diferindo do grupo 4H ($86.89\pm 0,32$) ($p<0,0001$). O grupo 4H também diferiu do grupo 2H ($p<0,0001$), demonstrando, assim, um pior desempenho.

Figura 12 – Incorporação de PEI por espermatozoides suínos



Avaliação das taxas de incorporação de PEI/FITC por espermatozoides suínos, utilizando em (B) diferentes concentrações de PEI, por (B) diferentes tempos de incubação. Letras diferentes sobscritas em cada barra representam diferença significativa ($P<0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Estes resultados são diferentes dos encontrados por Hsu e Uludag (2012), em que a concentração mínima de PEI, foi de 5 mg/mL e o tempo de incubação mínimo conseguido foi entre 2 e 6 horas, para níveis satisfatório de transfecção de culturas de células do estroma da medula óssea e fibroblastos normais do prepúcio humano. Esta diferença pode ser devido ao fato de que, no referido trabalho de , foram utilizadas células em cultura, as quais se encontram aderidas ao fundo da placa de crescimento

enquanto que no presente estudo foram utilizadas células em suspensão e com motilidade (espermatozoides). Quando as células encontram-se suspensas em meio líquido e a PEI é adicionada e homogeneizada, uma menor concentração de PEI é necessária, já que toda ela se distribuirá pela suspensão, possibilitando a interação entre a PEI e a célula-alvo mais facilmente. No entanto, com células aderidas, esta homogeneização não é possível, sendo necessária uma maior quantidade de PEI, já que a interação entre as micelas de PEI e as células aderidas se dará apenas em função da difusão micelar no meio e a camada celular exposta ao líquido..

Vale ressaltar que no presente utilizou-se a PEI ligada ao FITC e não a PEI complexada com plasmídeo como Hsu e Uludag (2012). O princípio de incorporação da PEI pelas células é decorrente da interação eletrostática das micelas (positivamente carregadas) com os fosfolipídios da membrana celular (negativamente carregados); ainda, a complexação da PEI com plasmídios (negativamente carregados) neutraliza em parte a carga positiva do nanocarreador, reduzindo, assim, a afinidade do carreador pelas células. Por outro lado, a derivatização da PEI com FITC, que ocorre nas aminas livres e protonáveis do polímero, também reduz o caráter catiônico do nanocarreador, mas como foi utilizada uma baixa razão molar de FITC (1mM) para a reação, possivelmente as micelas de PEI/FITC obtidas possuíam um caráter catiônico superior.

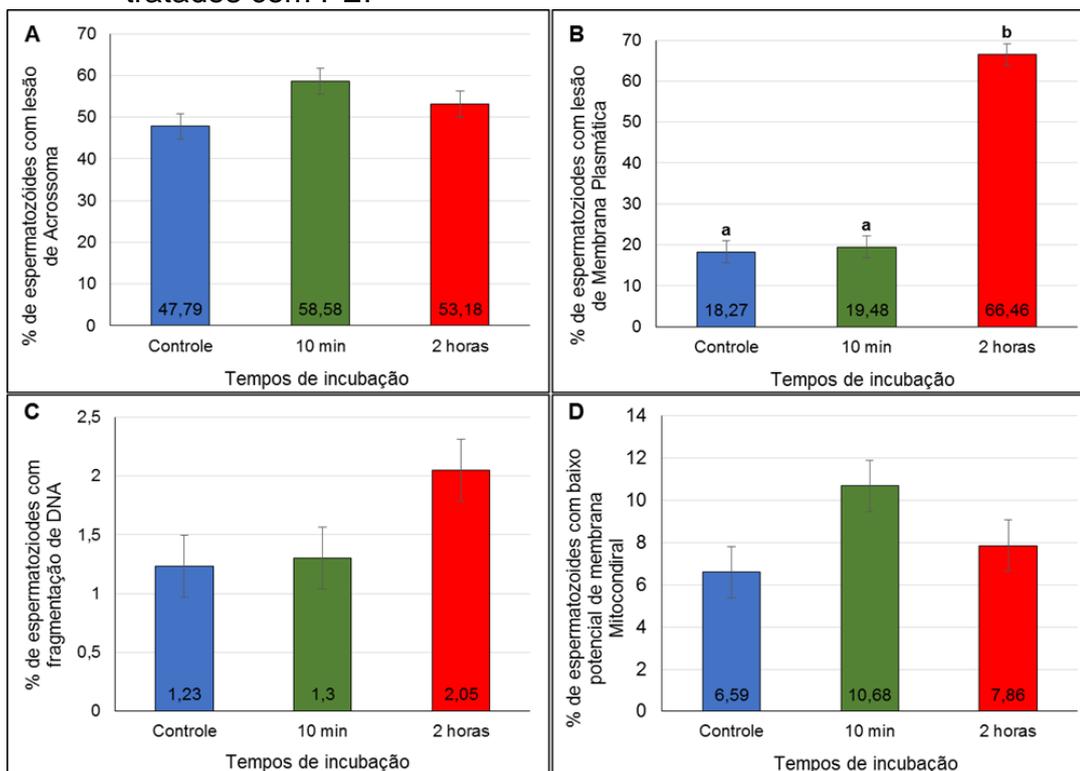
Vale ressaltar que não existem trabalhos relatando a transfecção de espermatozoides de qualquer espécie utilizando PEI. Um único trabalho (FANG et al., 2017), utilizando nanopartículas magnéticas revestidas com PEI (MNP, do inglês *magnetics nanoparticles*) transfectou espermatozoides suínos visando a produção de um suíno transgênico. Contudo, neste caso a PEI foi usada como recobrimento das nanopartículas para favorecer a interação com as células; além disso, os espermatozoides foram submetidos a um campo magnético para potencializar a incorporação das nanopartículas. Apesar de efetiva para a transfecção das células, envolve mais etapas para obtenção do nanocarreador e requer instrumentação mais complexa, o que pode se tornar um limitante para ampla utilização.

Para utilização no experimento seguinte, decidiu-se utilizar a concentração de 0,5 mg/mL, pois todas as concentrações de PEI utilizadas possibilitaram taxas semelhantes de incorporação de PEI. Quanto ao tempo de incubação, optou-se por utilizar 10 minutos e 2 horas, pois mostraram as melhores taxas incorporação PEI.

7.2. EXPERIMENTO 2. EFEITO DA POLIETILENOIMINA NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

As taxas de marcação para cada uma das sondas foram comparadas com as de um grupo controle, ou seja, um grupo que não foi incubado com PEI. Os dados das análises da viabilidade espermática utilizando sondas estão representados nos gráficos da figura 13.

Figura 13 – Avaliação da viabilidade espermática de espermatozoides suínos tratados com PEI



Taxas de **a)** lesão de acrossoma (LA); **b)** lesão de membrana citoplasmática (LMC); **c)** fragmentação de DNA (fDNA); **d)** baixo potencial de membrana mitocondrial (bPMM). Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Para a internalização à célula, a PEI se liga aos proteoglicanos da membrana citoplasmática, desestabilizando a membrana, provocando a translocação (passagem

da superfície interna da membrana para a externa, neste caso) de fosfatidilserina, que é uma característica da apoptose (HUNTER; MOGHIMI, 2010). Estes autores encontraram que, a PEI ramificada causa mais rapidamente a translocação de fosfatidilserina em concentrações de 20 µg/mL ou superiores. A citotoxicidade também é maior quando o tempo de incubação for superior a uma hora.

Kafil e Omid (2011) também encontraram a citotoxicidade da PEI possui alta correlação com a concentração, bem como com a estrutura do polímero. Estes autores encontraram que células A431 tratadas com a PEI ramificada possuem viabilidade de aproximadamente 60%, enquanto que, quando tratadas com PEI linear, a viabilidade fica em torno de 80%. A viabilidade celular deu-se pela mensuração dos índices de apoptose, utilizando-se o teste MTT.

No presente estudo, quando da avaliação de integridade de acrossoma (Figura 13A), não houve diferença entre os grupos ($p=0.0634$). A taxa de lesão acrossomal (LA) foi de $47,79\% \pm 3,08$ para o grupo controle, $58,58\% \pm 3,08$, para o grupo 10 minutos e $53,18\% \pm 3,08$ para o grupo 2H (Figura 12) demonstrando que espermatozoides suínos tratados com PEI não ocorre aumento nos índices de lesão de membrana acrossomal.

Com relação à avaliação de integridade da membrana citoplasmática (Figura 13B), a taxa de lesão de membrana citoplasmática (LMC) do grupo controle foi de $18,27 \pm 2,70\%$, não diferindo do grupo 0H ($19,48 \pm 2,70\%$) ($p=0,9464$), mas diferindo do grupo 2H ($66,46 \pm 2,70\%$) ($p < 0,0001$). O grupo 0H e 2H diferiram entre si ($p < 0,0001$), demonstrando que o tratamento espermatozoides suínos com PEI provoca aumento nos índices de lesão de membrana plasmática, quando da incubação por 2 horas, em comparação com os demais grupos (Figura 13B).

Este último dado corrobora o descrito por Hunter e Moghimi, (2010), os quais citam que a incubação da PEI com a célula por mais de uma hora aumenta a lesão de membrana, pelo incremento na translocação de fosfatidilserina. Entretanto, conforme estes autores, seria esperado que ocorresse grande aumento das lesões nestas membranas em todos os outros grupos, já que utilizou-se aqui PEI na concentração de 0,5 mg/mL, ou seja, 25 vezes superior à concentração indicada como prejudicial as células, o que não foi observado.

Na análise da integridade de cromatina (Figura 13C), não houve diferença entre os grupos ($p=0.6201$). Os índices de DNA fragmentado (fDNA) do grupo controle foi de

1,23% \pm 0,65%, grupo 10 minutos (1,30% \pm 0,65) e do grupo 2H (2,05% \pm 0,65), demonstrando que o tratamento espermatozoides suínos com PEI não afetou os índices de integridade de cromatina.

Conforme Kafil e Omid (2011), quando no núcleo celular, a PEI pode danificar o DNA por sua capacidade de interagir com ácidos nucleicos, afetando, assim, os processos nucleares, o que pode levar a morte celular. Estes autores avaliaram a integridade da cromatina pelo teste cometa, em células A431 tratadas com PEI e encontraram uma alta taxa de fragmentação de DNA (potencial zeta de 28,7 % \pm 7,9 mV), o que não foi observado no presente estudo. Isso pode se dever ao fato de que, em espermatozoides, o DNA é enovelado com protamina e condensado mais densamente em comparação com DNA enovelado com histonas, o que confere certa proteção ao DNA espermático.

A perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM) deve-se a atividade da caspase (cysteinyll aspartate-specific proteases) do tipo 3. A liberação de citocromo-C pela membrana mitocondrial faz com que as caspases se ativem, levando a apoptose (HUNTER e MOGHIMI, 2010). Estes autores demonstraram que, em células Jurkat, a PEI pode desencadear este processo pela ativação da caspase-3, mesmo quando em concentração tão baixa quanto 0.1 μ g/mL e que na concentração de 30 μ g/mL é possível liberar até 60% do citocromo C, indicando alta perda de PMM. Não consta, porém, no trabalho as taxas de PPM encontrados, haja vista da utilização de JC-1 para tal finalidade.

Na avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Figura 13D), não houve diferença entre os grupos ($p=0.1292$). A taxa de espermatozoides com baixo PMM (bPMM) do grupo controle foi de 6,59 \pm 1,40%, do grupo 10 minutos 10,68 \pm 1,40% e do grupo 2H 7,86 \pm 1,40%. Isso demonstra que o tratamento espermatozoides suínos com PEI não afetou os índices de potencial de membrana mitocondrial, diferente do relatado por Hunter e Moghimi, 2010.

7.3. EXPERIMENTO 3. OTIMIZAÇÃO DO MEIO E DA TEMPERATURA PARA A RECUPERAÇÃO ESPERMÁTICA PÓS ELETROPORAÇÃO

Para a recuperação da membrana plasmática (RIMP) que é calculada utilizando a fórmula descrita na figura 14, houve interação entre o meio e a temperatura ($p=0,0008$).

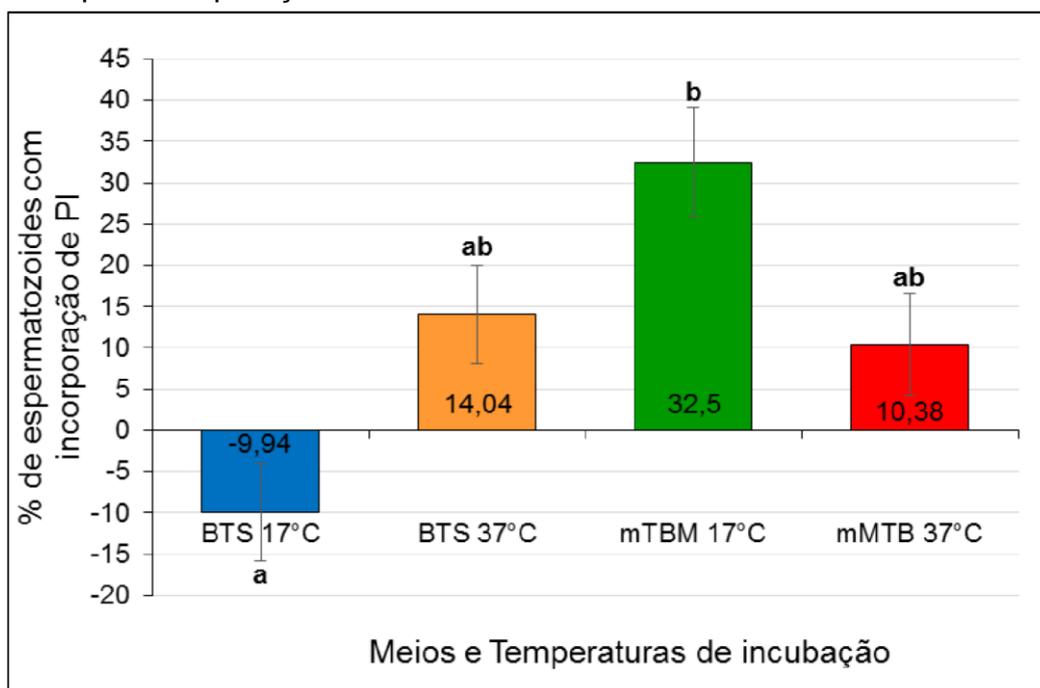
O BTS a 17°C teve uma RIMP de $-9,94\% \pm 5,91$, única combinação capaz de recuperar as membranas acima dos valores do período pré-recuperação, sendo mais eficiente que o mTBM a 17°C ($32,5\% \pm 5,91$) ($p < 0,0001$), porém sem diferença com o BTS a 37°C ($14,04\% \pm 6,61$) ($p = 0,0525$) e o mTBM a 37°C ($10,38\% \pm 6,27$) ($p = 0,1085$), conforme demonstrado na figura 15.

Figura 14 – Formula para o cálculo da recuperação da membrana plasmática de espermatozoides submetidos a eletroporação

$$RIMP = (PI2 - PI0) - (PI1 - PI0)$$

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Figura 15 - Interação entre o meio e a temperatura na recuperação espermática pós eletroporação



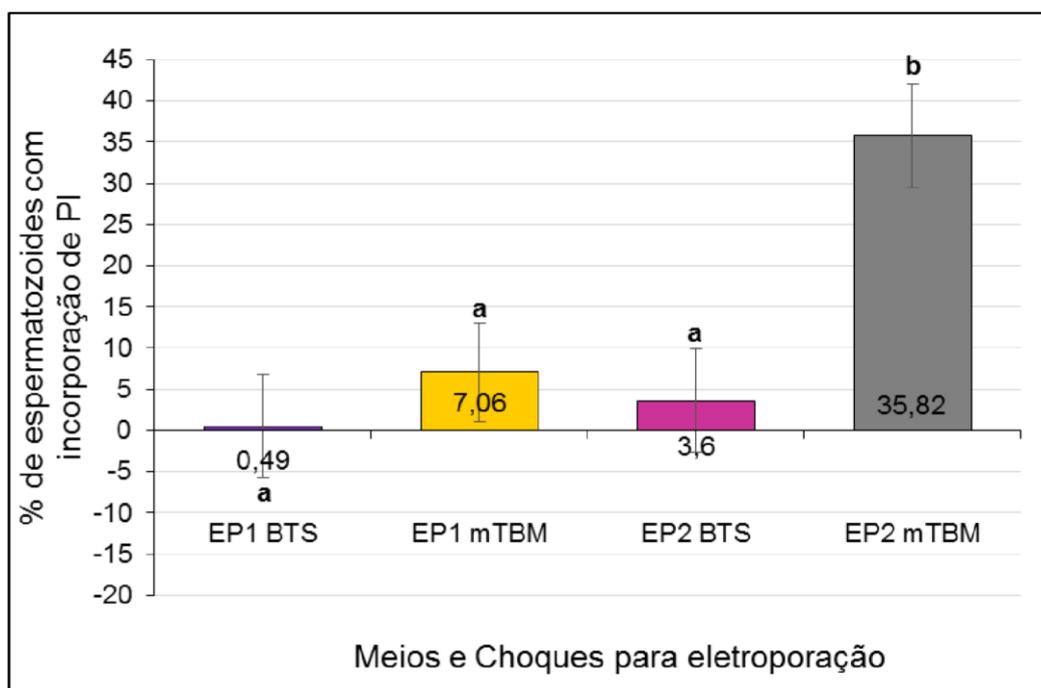
Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

O BTS é um diluente utilizado para a conservação de sêmen suíno, que, como rotineiro na suinocultura, faz-se utilizando temperaturas entre 16 e 18°C. Sua utilização tem como objetivo preservar as características fertilizantes dos espermatozoides suínos, sendo, por estas características, que possibilitou recuperação da membrana citoplasmática dos espermatozoides após a eletroporação. Já o mTBM, por outro lado, é um meio utilizado para a fertilização *in vitro* em suínos e sua utilização visa a capacitação do espermatozoide para a fertilização. Quanto a temperatura de 37°C, esta permite que o espermatozoide fique ativo, gerando energia e desgastando-o, caso ele não seja prontamente utilizado na fertilização. Por estas características, tanto o mTBM quanto a temperatura de 37°C, mesmo quando esta estava associada ao BTS, permitiram menor recuperação da membrana citoplasmática dos espermatozoides.

Observou-se também interação entre a EP e o meio utilizado ($p=0,0471$). O meio mTBM utilizado juntamente com a EP2 apresentou piores resultados que os demais grupos, apresentando RIMP de $35,82\pm 6,27\%$ sendo seguido pela combinação do meio mTBM e EP1 com RIMP de $7,06\pm 5,91\%$ ($p=0,0018$) e por BTS em conjunto com EP2 $3,60\pm 6,27\%$ ($p=0,0056$). Apresentou melhores resultados o meio BTS quando com a EP1, (RIMP de $0,49\pm 6,27\%$) ($p=0,0022$) como ilustrado na figura 16. Este resultado fica evidenciado pelas características de cada meio, como descrito anteriormente aliado a característica de cada EP. A EP2 possibilita que os poros abertos na membrana citoplasmática sejam maiores e tenham maior duração que os poros da EP1.

Assim, fica demonstrado que, de modo geral, o meio BTS, principalmente a 17°C, apresentou-se mais eficiente na recuperação integridade da membrana plasmática de espermatozoides suínos submetidos a eletroporação.

Figura 16 - Interação entre o meio e eletroporação na recuperação espermática pós eletroporação



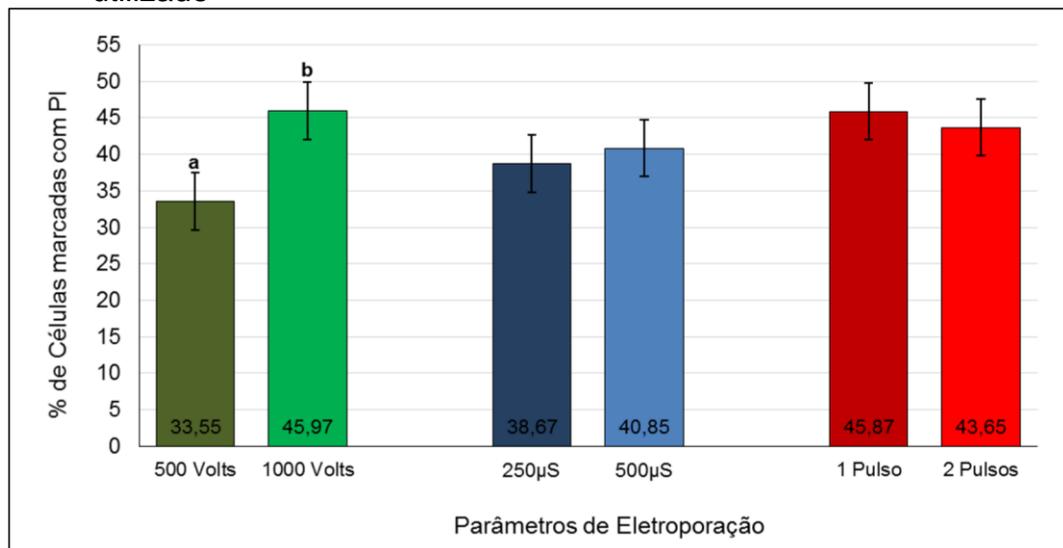
Letras diferentes sobscritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

7.4. EXPERIMENTO 4. DETERMINAÇÃO DA VOLTAGEM, TEMPO E NÚMERO DE PULSOS PARA ELETROPORAÇÃO DE ESPERMATOZOIDE SUÍNOS

Todos os parâmetros analisados (voltagem, tempo e pulso) não demonstraram interação entre si ($p = 0,3271$). Os dados da análise em conjunto dos parâmetros de eletroporação estão apresentados na figura 17. Quando analisados individualmente, houve diferença entre as voltagens utilizadas ($p = 0,0276$), sendo que quando utilizado 500 Volts, observou-se taxa de incorporação de PI de $33,55\% \pm 3,89$, enquanto que quando se utilizou 1000 Volts a taxa de incorporação foi de $45,97\% \pm 3,89$.

Não houve diferença entre os tempos utilizados ($p = 0,6940$), sendo que para $250 \mu\text{S}$ a taxa de incorporação foi de $38,67 \pm 3,95\%$ e para $500 \mu\text{S}$ a taxa de incorporação foi de $40,85 \pm 3,83\%$. Também, para o número de pulsos utilizados, não houve diferença entre os grupos ($p = 0,1625$), sendo que para 1 pulso a taxa de incorporação foi de $45,87 \pm 3,89\%$ e para 2 pulsos, a taxa de incorporação foi de $43,65 \pm 3,89\%$. A figura 17 ilustra os resultados encontrados na comparação individual dos parâmetros da eletroporação.

Figura 17 – Incorporação de Iodeto de Propídio conforme o parâmetro de eletroporação utilizado



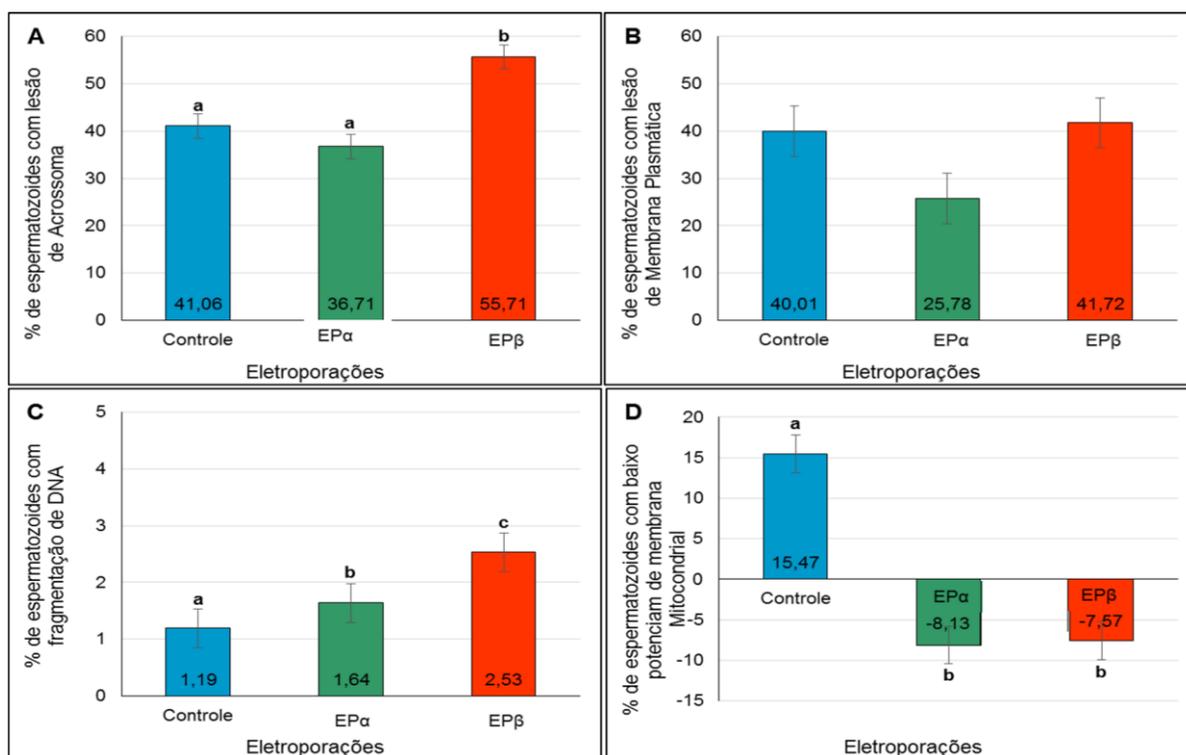
Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão.

Assim, estabeleceu-se como melhores parâmetros a serem utilizados no experimento seguinte, o grupo 500 volts, 500 μ S e 2 pulsos e grupo 1000 volts, 500 μ S e 2 pulsos, pois, embora no conjunto não tenha havido diferença estatística, foram os grupos que tiveram as maiores taxas absolutas de incorporação de PI.

7.5. EXPERIMENTO 5. EFEITO DA ELETROPORAÇÃO NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

As taxas de marcação com cada uma das sondas foram comparadas com as taxas de marcação de um grupo controle, ou seja, um grupo não eletroporado, mas em que empregou-se todas as sondas anteriormente citadas. Os dados das análises da viabilidade espermática utilizando sondas estão representados nos gráficos da figura 18.

Figura 18 - Avaliação da viabilidade de espermatozoides suínos submetidos à eletroporação



Taxas de lesão de **A)** acrossoma; **B)** membrana citoplasmática; **C)** cromatina. **D)** potencial de membrana mitocondrial. Letras diferentes em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão.

A taxa de LA do grupo controle foi de $41,06 \pm 2,54\%$, não diferindo do grupo EP α ($36,71 \pm 2,54\%$) ($p = 0,4957$), porém diferindo do grupo EP β ($55,77 \pm 2,54\%$) ($p = 0,0011$). O grupo EP α e EP β também diferiram entre si ($p < 0,0001$) (figura 18.A). Isso demonstra que a eletroporação com intensidade elétrica mais baixa, como da EP α não provoca aumento nos índices de lesão de membrana acrossomal quando comparado ao grupo controle. Em contrapartida, quando utilizada intensidade elétrica mais alta, como da EP β , a integridade de acrossoma não é mantida.

Estes dados são corroborados com os de Tomkins e Houghton (1988), os quais eletroporando espermatozoides humanos, encontraram aumento da reação acrossomal (RA), quando utilizado voltagens superiores a 750 volts (RA= 55%). Já, quando utilizado 500 volts, não houve incremento significativo na reação acrossomal (RA= 25%). A reação acrossomal em espermatozoides ocorre devido a despolarização da membrana celular, conforme descrito por Schackmann et al. (1981) e a eletroporação promove esta despolarização.

A taxa de LMC do grupo controle foi de $40,01 \pm 5,34\%$, não diferindo do grupo

EP α ($25,78 \pm 5,34\%$) ($p=0,1631$), nem do grupo EP β ($41,72 \pm 5,34\%$) ($p=0,9689$) (figura 18.B). Também não houve diferença entre os grupos EP α e EP β ($p=0,1041$). Fica evidenciado que a eletroporação, mesmo com uma intensidade elétrica mais alta, não provoca nos índices de lesão de membrana plasmática. A manutenção das taxas de LMC deu-se pelo emprego da recuperação da membrana citoplasmática, conforme determinado no experimento 3, item 6.4.1.

A taxa de FDNA do grupo controle foi de $1,19 \pm 0,34\%$, não diferindo do grupo EP α ($1,64 \pm 0,34\%$) ($p=0,6185$), porém diferindo do grupo EP β ($2,53 \pm 0,34\%$) ($p=0,0241$). O grupo EP α e EP β não diferiram entre si ($p=0,1684$) (figura 18.C). A eletroporação apenas quando utilizada em intensidade mais alta, afetou negativamente as taxas de integridade de cromatina, em comparação com o grupo controle, porém, quando em comparação a mais baixa, não houve incremento de lesão no DNA.

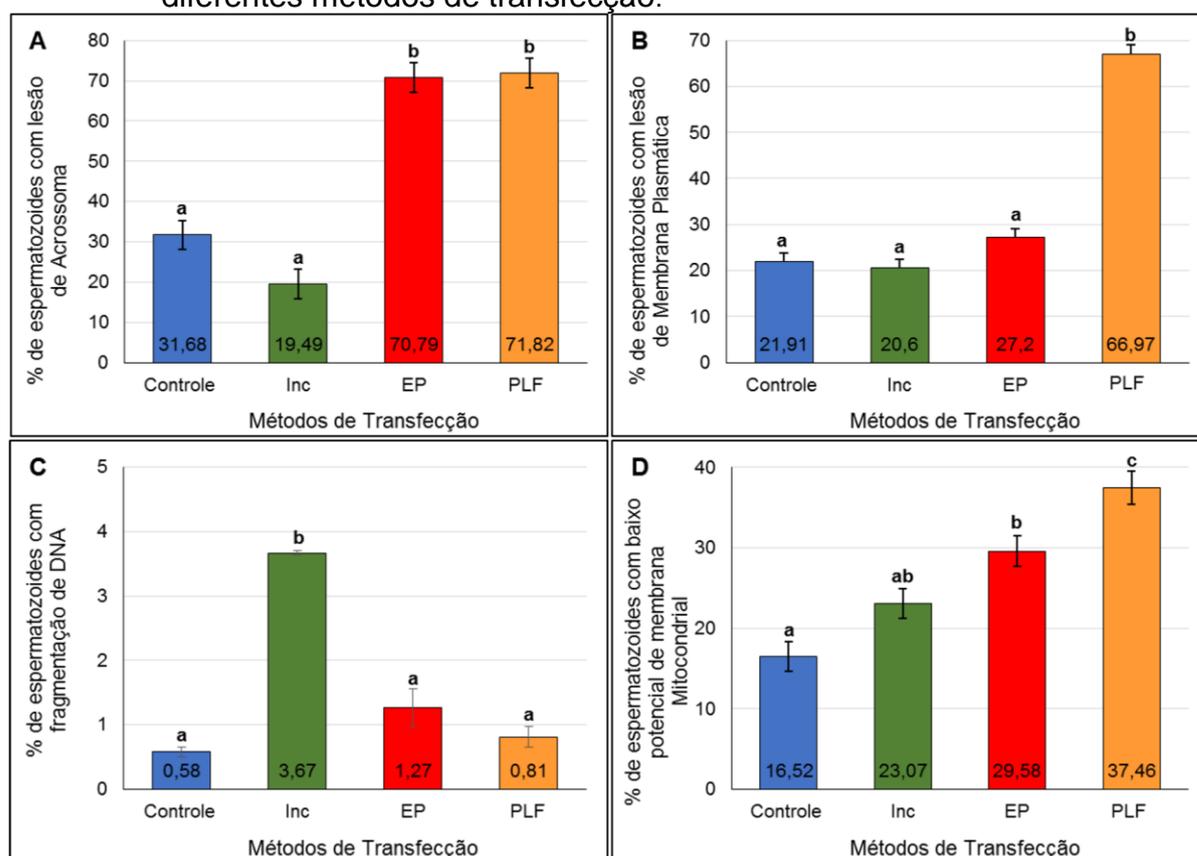
A taxa de bPMM (figura 18.D) do grupo controle foi de $15,47 \pm 2,32\%$, diferindo do grupo EP α ($-8,13 \pm 2,32\%$) ($p < 0,0001$) e também do grupo EP β ($-7,57 \pm 2,32\%$) ($p < 0,0001$). O grupo EP α e EP β não diferiram entre si ($p=0,9840$). Isso demonstra que a eletroporação afetou positivamente os índices de potencial de membrana mitocondrial, ou seja, a eletroporação, em ambas as configurações utilizadas, melhora o potencial de membrana mitocondrial.

A eletroporação pode causar a desestabilização no transporte de elétrons da membrana mitocondrial, o que leva à produção de grandes quantidades de espécies de oxigênio reativo (ROS), conforme descrito por Cavalcanti et al. (2016). Estas ROS podem causar danos ao DNA espermático. Porém, no presente trabalho, este mecanismo parece não ter ocorrido, visto que nenhum dos dois danos (a mitocôndria e a integridade de cromatina) foi observado. Apenas ocorreu aumento da fragmentação de DNA, quando utilizada a voltagem mais alta, o que também não pode ser explicado por este mecanismo de lesão.

7.6. EXPERIMENTO 6. EFEITO DA TRANSFEÇÃO USANDO POLIFECÇÃO E ELETROPORAÇÃO NA VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

As taxas de marcação com cada uma das sondas nos grupos transfectados por polifecção (PLF), nos grupos da eletroporação (EP) e da incubação, foram comparadas com as taxas de marcação de um grupo controle, ou seja, um grupo de espermatozoides não transfectados por nenhum dos métodos. Os dados das análises da viabilidade espermática utilizando sondas fluorescentes estão representados nos gráficos da figura 19.

Figura 19 – Avaliação da viabilidade de espermatozoides suínos submetidos a diferentes métodos de transfecção.



Avaliação da taxa de **a)** lesão de membrana acrossomal; **b)** lesão de membrana plasmática; **c)** fragmentação de DNA; **d)** baixo potencial de membrana mitocondrial. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A taxa de LA (figura 19.A) do grupo controle foi de $31,68 \pm 3,61\%$, diferindo do grupo Incubação ($19,49 \pm 3,61\%$) ($p=0.0247$), do grupo PLF ($70,79 \pm 3,68\%$) ($p<0,001$), e do grupo EP ($71,82 \pm 3,68\%$) ($p<0,001$). O grupo Incubação também diferiu do grupo PLF ($p<0,001$) e do grupo EP ($p<0,001$). Os grupos PLF e EP não diferiram entre si ($p=0.8306$). Isso demonstra que, em comparação com o grupo controle, apenas a incubação mantém constante os índices de lesão de membrana acrossomal.

No método de incubação, a internalização do plasmídeo a célula se dá, preferentemente, na região subacrossomal, onde se encontram o MCHII (FRANCOLINI et al, 1993). Com isso, o acrossoma permanece intacto. As condições de meio e temperatura utilizadas, também favorecem a manutenção da integridade acrossomal, já que se realizou nas mesmas condições utilizadas para preservação de sêmen suíno resfriado.

A eletroporação, conforme Tomkins e Houghton (1988), pode provocar aumento da lesão acrossomal, o que não foi observado no experimento 5. Porém, aqui estava também presente o plasmídeo. Como a eletroporação também abre poros na membrana acrossomal, o plasmídeo, devido ao seu tamanho (14,5 kb) ao passar pelos poros abertos na membrana, pode ter contribuído para a lesão no acrossoma. A lesão acrossomal em espermatozoides também ocorre devido à despolarização da membrana celular, conforme descrito por Schackmann et al. (1981) e a eletroporação promove esta despolarização.

A PLF afeta negativamente a integridade do acrossoma, devido à via bioquímica desencadeada quando da passagem da PEI pela membrana acrossomal para entrada na célula. Na internalização na célula, a PEI se liga aos proteoglicanos da membrana citoplasmática, desestabilizando a membrana, provocando a translocação (passagem da superfície interna da membrana para a externa, neste caso) de fosfatidilserina, que é uma característica da apoptose (HUNTER; MOGHIMI, 2010). O acrossoma também contém a fosfatidilserina, no lado externo de sua membrana, conforme descrito por Kurz et al. (2005). Assim sendo, a via fosfatidilserina pode tanto afetar a membrana acrossomal quanto a membrana citoplasmática. A taxa de LMC do grupo controle foi de $21,91 \pm 3,55\%$, não diferindo do grupo INC ($20,6 \pm 3,81\%$) ($p=0,8037$) e do grupo EP ($27,2 \pm 3,55\%$) ($p=0,3101$), porém diferindo do grupo PLF ($66,97 \pm 3,55\%$) ($p<0,001$). Os grupos INC não diferiu do grupo EP ($p=0,2224$) mas diferiu do PEI ($p<0,001$). Os grupos PLF e EP também diferiram entre si ($p<0,001$) (figura 19.B). Isto denota que a

IMC não é afetada tanto pela incubação, quanto pela eletroporação, métodos que conseguem mantê-la.

A incubação não tem interferência na integridade da membrana citoplasmática, pois foi realizada utilizando-se o meio BTS a 17 °C, que é condição de preservação do sêmen suíno. Este mesmo meio e temperatura é o utilizado para incubação pós-eletroporação para promover a recuperação das membranas plasmáticas, assim, este método também não afeta a IMC. Ainda, a internalização do plasmídeo, no método da incubação (método da SMGT convencional), ocorre utilizando o mecanismo molecular via MHCII e CD4 (LAVITRANO et al., 1997), o que favorece que a membrana plasmática não seja lesionada.

A PLF é o único método a afetar negativamente a membrana, o que ocorre pela ativação da via da fosfatidilserina pela PEI, como previamente descrito. Porém, a ativação desta via apareceu unicamente quando a PEI esteve associada ao plasmídeo, já que tais lesões não ocorreram no experimento 2, quando a PEI foi analisada sem associações, sugerindo que o diâmetro do complexo PEI-DNA foi importante para as lesões ocorrerem.. Também, a internalização não se dá por mecanismos moleculares da célula, e sim pela interação eletrostática entre a PEI e a membrana celular, forçando a passagem das micelas de PEI pela bicamada lipídica entre as moléculas de fosfolípidios, lesionando, possivelmente, a membrana citoplasmática.

A taxa de fDNA (figura 19.C) do grupo controle foi de $0,58 \pm 0,08\%$, diferindo do grupo incubação ($3,67 \pm 0,03\%$) ($p < 0,001$) sendo este o único grupo que afetou negativamente a integridade da cromatina. A EP teve taxa de fDNA de $1,27 \pm 0,29\%$, não diferindo do grupo controle ($p = 0,1849$), assim como a PLF ($0,81 \pm 0,16\%$) ($p = 0,9772$). O grupo Incubação diferiu do grupo EP e PLF ($p < 0,001$), os quais não apresentaram diferença entre si ($p = 0,9772$).

Em comparação com os experimentos anteriores, nos quais não se utilizou o plasmídeo para transfecção, a PLF teve uma redução na fDNA. Isso corrobora o descrito por Kafil e Omid (2011), que citam que a PEI ligada ao plasmídeo pode ter uma redução de até 50% nos danos ao DNA. Conforme estes autores, a PEI ramificada poderia, devido aos seus ramos, causar interação com porções intracelulares, como o DNA, aumentando os danos, o que não foi observado no presente estudo.

A eletroporação poderia afetar a integridade do DNA, pela ação das ROS produzidas nas mitocôndrias desestabilizadas, de acordo com o descrito por Cavalcanti et al. (2016), porém, isso não ocorreu no presente trabalho.

A taxa de bPMM do grupo controle foi de $16,52 \pm 1,88\%$, diferindo do grupo incubação que teve bPMM de $23,07\% \pm 1,88$ ($p=0.0211$), do grupo EP com taxa de $29,58 \pm 1,88\%$ ($p < 0,0001$) e do grupo PLF, com bPMM de $37,46 \pm 2,02\%$ ($p < 0,0001$). O grupo Incubação diferiu do grupo EP ($p=0,0218$) e do grupo PLF ($p < 0,001$), os quais também apresentaram diferença entre si ($p=0,0084$) (figura 19.D).

A internalização do plasmídeo se dá, na SMGT, por processo ativo, utilizando mecanismo anteriormente descrito no item 5.3.1, o que requer gasto de energia pelos espermatozoides. Esta energia é provida pela mitocôndria, que é responsável pelo metabolismo da glicose. Quanto maior o tamanho do plasmídeo maior a quantidade de energia requerida e maior atividade terão as mitocôndrias. A internalização de plasmídeos muito grandes pode levar a perda do potencial de membrana mitocondrial pelo grande esforço desempenhado pela organela, para suprir a demanda energética. Isto fica evidenciado no fato de que, quando utilizado plasmídeos menor, como em Feitosa et al. (2009), que utilizou plasmídeo com 4 kb, não houve diminuição do PMM, ao contrário do ocorrido aqui, utilizando plasmídeo de 14,5 kb de tamanho.

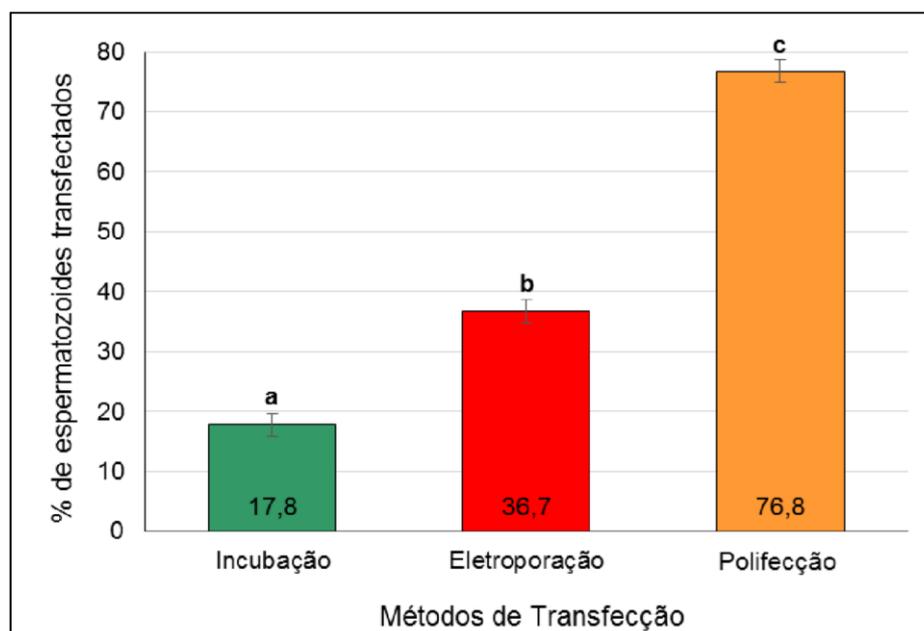
A eletroporação, aqui, teve efeito negativo no PMM, que pode ter ocorrido conforme descrito por Cavalcanti et al. (2016) que citam que a EP pode causar a desestabilização no transporte de elétrons da membrana mitocondrial, o que leva à produção de grandes quantidades de espécies de oxigênio reativo (ROS). Também, a presença do plasmídeo parece ter sido importante para a diminuição da PMM neste caso, já que é o único fator acrescido em relação ao experimento 5, quando o mesmo parâmetro de eletroporação não teve este efeito na membrana mitocondrial.

A PLF também teve efeito negativo na PMM. A perda do potencial de membrana mitocondrial deve-se a atividade da caspase (cysteinyll aspartate-specific proteases) do tipo 3. A liberação de citocromo-C pela membrana mitocondrial faz com que as caspases se ativem, levando a apoptose (HUNTER; MOGHIMI, 2010).

7.7. EXPERIMENTO 7. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS POLIFECÇÃO, ELETROPORAÇÃO E INCUBAÇÃO NA TRANSFEÇÃO DE ESPERMATOZOIDEOS SUÍNOS

As taxas de transfecção para cada método, calculadas a partir dos resultados da análise por FISH, foram comparadas entre si e os resultados estão ilustrados no gráfico da figura 20. Todos os tratamentos diferiram entre si ($p < 0,0001$). O método da incubação, o qual é a metodologia básica de transfecção na SMGT, foi usado como controle e teve taxa de transfecção de $17,80 \pm 1,07\%$, semelhante ao encontrado por Lavitrano et al. (2003), que obteve em torno de 20% de espermatozoides suínos em que o plasmídeo internalizou o núcleo. Estes autores citam, contudo, que a taxa da SMGT pode chegar a 80%

Figura 20 – Transfecção de espermatozoides suínos por diferentes metodologias



Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A taxa de transfecção pela eletroporação foi de $36,70 \pm 2,78\%$, ou seja, 106% a mais que o método INC, significativamente superior à obtida por Horan et al. (1992), o qual conseguiu incremento de 5 a 10% na captação de eDNA por espermatozoides suínos eletroporados. Esta taxa mais alta de transfecção deu-se pelo fato de que no presente

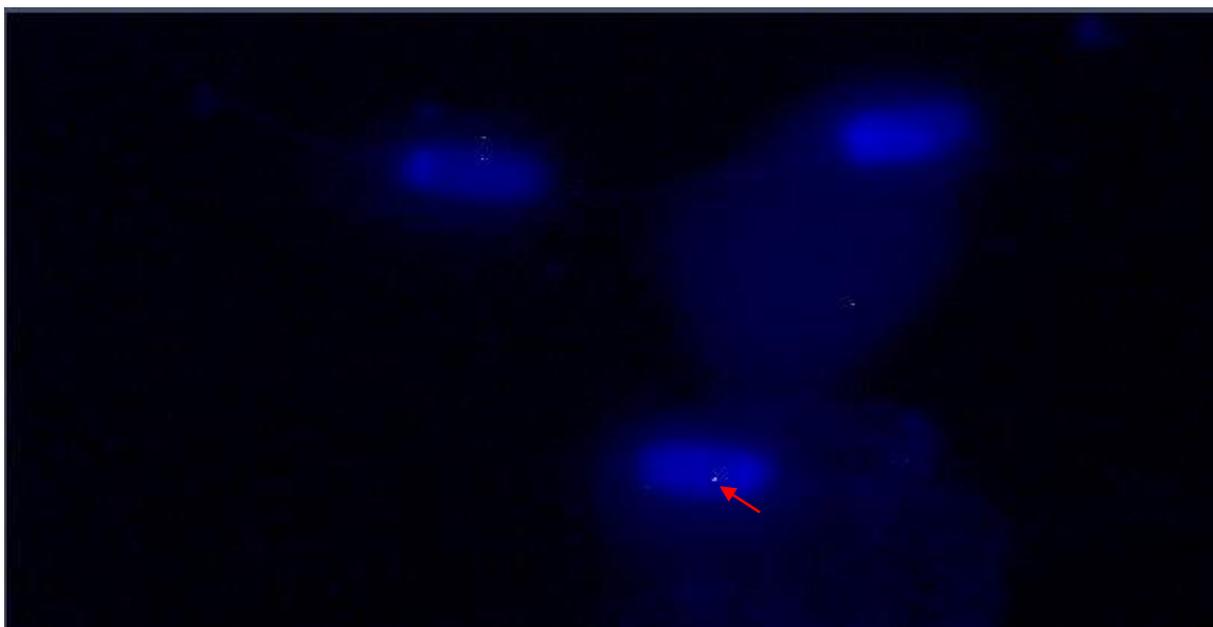
trabalho procurou-se, anteriormente a transfecção, otimizar os parâmetros da eletroporação, visando alcançar a maior taxa possível de transfecção.

Como ponto desfavorável, este método demonstrou uma alta taxa de lesão de acrossoma, devido a reação acrossomal que o método proporciona. Porém, a reação acrossomal pode ser desejada, caso se deseje utilizar os espermatozoides transfectados por este método, na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, do inglês *intracytoplasmic sperm injection*) ou em protocolos de fecundação *in vitro*.

A taxa de transfecção do grupo pelo método da polifecção foi de $76,8 \pm 3,09\%$, superior ao descrito por Hsu e Uludag (2012), os quais obtiveram taxas de 30 a 35% de sucesso. Entretanto, a polifecção provocou altas taxas de lesão de acrossoma e de membrana citoplasmática, ambos induzidos pela via da fosfatidilserina, tornando este mais indicado quando os espermatozoides transfectados possam ser utilizados na sequência por técnicas de fertilização *in vitro*, principalmente na ICSI.

Os resultados obtidos na FISH, para a marcação para a sonda controle, bem como para a marcação para quantificação da transfecção estão ilustrados, respectivamente, nas figuras 21 e 22.

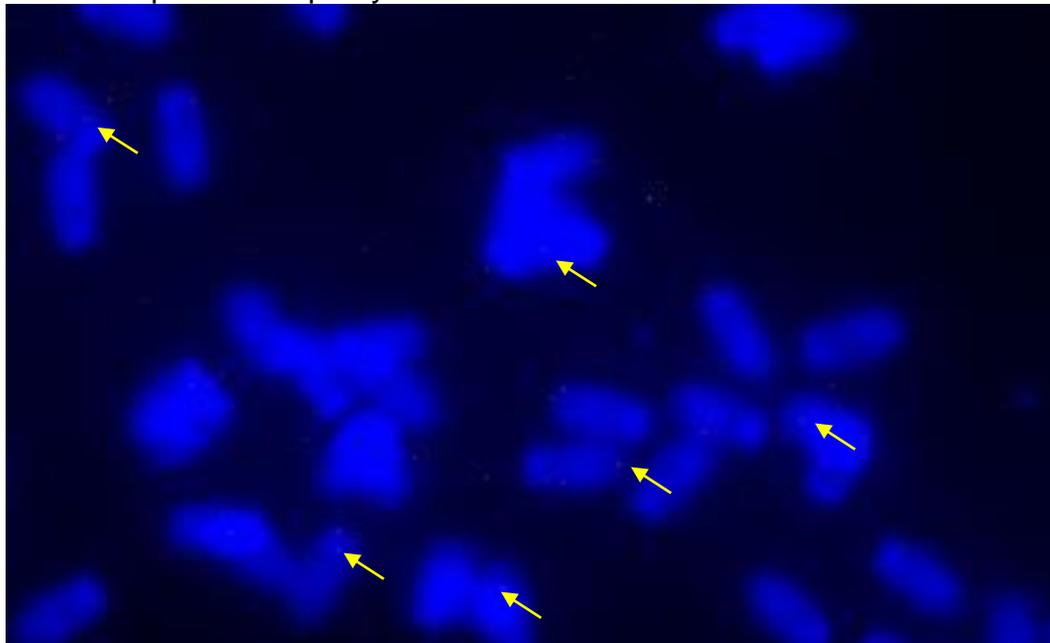
Figura 21 – Espermatozoides suínos, marcação controle com Cy3 para o gene SRY na FISH



Visualização do gene suíno SRY, marcado com o cromógeno Cy3, utilizado como controle hibridização

na FISH. Núcleos corados com DAPI. Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Figura 22 – Espermatozoides suínos, marcação com Cy5 (setas) para o gene eGFP do plasmídeo pmhyGENIE-5 na FISH



Visualização do gene suíno eGFP, marcado com o cromógeno Cy5, utilizado como sonda teste na hibridização na FISH. Núcleos corados com DAPI.

8. CONCLUSÃO

A transfecção pela incubação dos espermatozoides com o plasmídeo pmhyGENIE-5 foi, dentre os métodos utilizados, o que apresentou as menores taxas de transfecção. Embora tendo taxas de transfecção razoáveis, este método não demonstrou ser satisfatório, haja vista que, com o uso de outras metodologias, podese conseguir índices de transfecção superiores. Ambos os métodos, polifecção e eletroporação possibilitaram maiores taxas de transfecção em relação à incubação. A eletroporação apresentou taxas de transfecção intermediário, sendo seguida pela polifecção que possibilitou uma maior taxa de transfecção de espermatozoides suínos.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A despeito das taxas de transfecção dos métodos eletroporação e polifecção, estes demonstraram altas taxas de lesão de acrossoma e de membrana citoplasmática, ambos induzidos pela via da fosfatidilserina. Por este motivo, maiores estudos devem ser realizados visando alternativas para promover a recuperação dos espermatozoides após os processos de transfecção. Por outro lado, tais lesões não são empecilhos para a fertilização utilizando biotécnicas como a ICSI ou a fecundação *in vitro*. Assim sendo, para ambas as metodologias são recomendadas quando os espermatozoides transfectados por estes métodos puderem ser utilizados em seguida nestas biotécnicas de fertilização.

REFERÊNCIAS

- ANZAR, M.; BUHR, M. M. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 65, n. 4, p. 683–690, 2006.
- AREZZO, F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. **Cell Biology International Reports**, n.73, 1989.
- AUTIERO, M.; ABRESCIA, P.; GUARDIOLA, J. Interaction of seminal plasma proteins with cell surface antigens: Presence of a CD4-binding glycoprotein in human seminal plasma. **Experimental Cell Research**, v. 197, n. 2, p. 268–271, 1991.
- BACCI, M. L.; ZANNONI, A.; DE CECCO, M.; FANTINATI, P.; BERNARDINI, C.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; R.GIOVANNONI; LAVITRANO, M.; SEREN, E.; FORNI, M. Sperm-mediated gene transfer-treated spermatozoa maintain good quality parameters and in vitro fertilization ability in swine. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1163–1170, 2009.
- BALL, B. A.; SABEUR, K.; ALLEN, W. R. Uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 115–116, 2006.
- BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBØLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1789–1802, 2005.
- BOU, G.; SUN, M.; LV, M.; ZHU, J.; LI, H.; WANG, J.; LI, L.; LIU, Z.; ZHENG, Z.; HE, W.; KONG, Q.; LIU, Z. A pre-breeding screening program for transgenic boars based on fluorescence in situ hybridization assay. **Transgenic Research**, v. 23, n. 4, p. 679–689, 2014.
- BRACKETT, B. G.; BARANSKA, W.; SAWICKI, W.; KOPROWSKI, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 2, p. 353–357, 1971.
- BRUEWER, A. R.; MOWAT, F. M.; BARTOE, J. T.; BOYE, S. L.; HAUSWIRTH, W. W.; PETERSEN-JONES, S. M. Evaluation of Lateral Spread of Transgene Expression following Subretinal AAV-Mediated Gene Delivery in Dogs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2013.

CABOT, R. A.; KÜHHOLZER, B.; CHAN, A. W. S.; LAI, L.; PARK, K.-W.; CHONG, K.-Y.; SCHATTEN, G.; MURPHY, C. N.; ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N.; PRATHER, R.S. Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. **ANIMAL BIOTECHNOLOGY**, n.12, v.2, p.205–214, 2001.

CAPECCHI, M. R. Altering the Genome Homologous Recombination by From ES Cells to Germ Line Chimera. **Science**, v. 244, n. 4910, p. 1288–1292, 1989.

CAPPELLO, F.; STASSI, G.; LAZZERESCHI, D.; RENZI, L.; DI STEFANO, C.; MARFÉ, G.; GIANCOTTI, P.; WANG, H. J.; STOPPACCIARO, A.; FORNI, M.; BACCI, M. L.; TURCHI, V.; SINIBALDI, P.; ROSSI, M.; BRUZZONE, P.; PRETAGOSTINI, R.; DELLA CASA, G.; CORTESINI, R.; FRATI, L.; LAVITRANO, M. hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer. **Transplantation Proceedings**, v. 32, n. 5, p. 895–896, 2000.

CAVALCANTI, P. V.; MILAZZOTTO, M. P.; SIMÕES, R.; NICHI, M.; DE OLIVEIRA BARROS, F. R.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. A. Cell viability of bovine spermatozoa subjected to DNA electroporation and DNase I treatment. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1312–1322, 2016.

CHAN, A. W.; HOMAN, E. J.; BALLOU, L. U.; BURNS, J. C.; BREMEL, R. D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14028–33, 1998.

CHEN, H. L.; YANG, H. S.; RANG HUANG; TSAI, H. J. Transfer of a foreign gene to Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) by direct testis-injection. **Aquaculture**, v. 253, n. 1–4, p. 249–258, 2006.

COLLARES, T.; CAMPOS, V. F.; DE LEON, P. M. M.; CAVALCANTI, P. V.; AMARAL, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A.; DESCHAMPS, J. C.; SEIXAS, F. K. Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N,Ndimethylacetamide. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 4, p. 613–620, 2011.

D'APICE, A. J. F.; COWAN, P. J. Xenotransplantation: The next generation of engineered animals. **Transplant Immunology**, v. 21, n. 2, p. 111–115, 2009.

DE CECCO, M.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; LAVITRANO, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M. A method for uptake quantification of multiple fluorescent DNAs in boar semen as an alternative to radiolabeling. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, n. 2, p. 61–65, 2010.

ESPONDA, P. Transfection of gametes: a method to generate transgenic animals. **International Journal of Morphology**, v.23, p.281-284, 2005.

FANG, G.; CHEN, W.; WANG, S.; WANG, Y.; LI, C.; ZHU, H.; WANG, H. Research Article Generation of Transgenic Pigs Overexpressing PID1 Gene Mediated by Magnetic Nanoparticles and Sperm. **Asian J. Anim. Vet. Adv.**, v.12, n.3, p.161-168, 2017.

FEITOSA, W. B.; MILAZZOTTO, M. P.; SIM, R.; ROVEGNO, M.; NICACIO, A. C.; VISINTIN, A.; ELENA, M.; AVILA, O. D. Bovine sperm cells viability during incubation with or without exogenous DNA. **Zygote** v. 17, n. June, p. 315–320, 2009.

FISCHER, D.; BIEBER, T.; LI, Y.; ELSÄSSER, H. P.; KISSEL, T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity **Pharmaceutical Research**, 1999. .

FONSECA, Vicente Otavio da; COLEGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de semen animal. Belo Horizonte: **CBRA**, 1992. 79p.

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 and Development**, v. 34, n. 2, p. 133–139, 1993.

GAGNÉ, M. B.; POTHIER, F.; SIRARD, M. A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, n. 1, p. 6–15, 1991.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; RUIZ, S.; GRULLÓN, L. A.; ONDIZ, A. De; GUTIÉRREZADÁN, A.; GADEA, J. Factors affecting porcine sperm mediated gene transfer, **Research in Veterinary Science**. v. 91, p. 446–453, 2011.

GOBERT, B.; AMIEL, C.; TANG, J.; BARBARINO, P.; BBNI, M. C.; FAURE, G. CD4like molecules in human sperm. **Federation of European Biochemistry Society Letters**, v. 261, n. 2, p. 339–342, 1990.

GOLOVAN, S. P.; MEIDINGER, R. G.; AJAKAIYE, a; COTTRILL, M.; WIEDERKEHR, M. Z.; BARNEY, D. J.; PLANTE, C.; POLLARD, J. W.; FAN, M. Z.; HAYES, M. a; LAURSEN, J.; HJORTH, J. P.; HACKER, R. R.; PHILLIPS, J. P.; FORSBERG, C. W. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 741–745, 2001.

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, n. 12, p. 7380–4, 1980.

GORDON, J. W.; RUDDLE, F. H. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse **SCIENCE**, v.214, 1981.

GUERRA, R.; CARBALLADA, R.; ESPONDA, P. Transfection of spermatozoa in bivalve molluscs using naked DNA. **Cell Biology International**, v. 29, n. 2, p. 159–164, 2005.

GUO, M. W.; WATANABE, T.; MORI, E.; MORI, T. Molecular structure and function of CD4 on murine egg plasma membrane. **Zygote**, v. 3, n. 1, p. 65–73, 1995.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD JR, C. E.; WALT, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680–683, 1985.

HORAN, R.; POWELL, R.; BIRD, J. M.; GANNON, F.; HOUGHTON, J. a. Effects of electropermeabilization on the association of foreign DNA with pig sperm. **Archives of andrology**, v. 28, n. 2, p. 105–114, 1992.

HORAN, R.; POWELL, R.; MCQUAID, S.; GANNON, F.; HOUGHTON, J. a. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. **Archives of andrology**, v. 26, n. 2, p. 83–92, 1991.

HSU, C. Y. M.; ULUDAĞ, H. A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. **Nature protocols**, v. 7, n. 5, p. 935–45, 2012.

HUNTER, A. C.; MOGHIMI, S. M. Cationic carriers of genetic material and cell death : A mitochondrial tale. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6–7, p. 1203–1209, 2010.

JAENISCH, R., MINTZ, B. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. **Proc. Nat. Acad. Sci.** V. 71, N.4, p. 1250-1254, 1974.

- KAFIL, V.; OMIDI, Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells. **BiolImpacts**, v. 1, n. 1, p. 23–30, 2011.
- KIM, J. H.; JUNG-HA, H. S.; LEE, H. T.; CHUNG, K. S. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 4, p. 515–526, 1997.
- KOLLER, B. H.; SMITHIES, O. Altering genes in animals by gene targeting. **Annual review of immunology**, v. 10, p. 705–30, 1992
- KURZ, A.; VIERTEL, D.; HERRMANN, A.; MU, K. membranes during capacitation and acrosome reaction. **Reproduction** n. 1997, 2004.
- LAVITRANO, M.; CAMAIONI, A.; FAZIO, V. M.; DOLCI, S.; FARACE, M. G.; SPADAFORA, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. **Cell**, v. 57, n. 5, p. 717–723, 1989.
- LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; ZANI, M.; FRAT, L.; SPADAFORA, C. The Interaction Between Exogenous DNA and Sperm Cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 161-169, 1992.
- LAVITRANO, M.; FORNI, M.; VARZI, V.; PUCCI, L.; BACCI, M. L.; DI STEFANO, C.; FIORETTI, D.; ZORAQI, G.; MOIOLI, B.; ROSSI, M.; LAZZERESCHI, D.; STOPPACCIARO, A.; SEREN, E.; ALFANI, D.; CORTESINI, R.; FRATI, L. Sperm-mediated gene transfer: Production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n. 8 A, p. 3508–3509, 1997.
- 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. 62, n. 233, p. 56–62, 1997.
- LAVITRANO, M.; STOPPACCIARO, A.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; FIORETTI, D.; PUCCI, L.; DI STEFANO, C.; LAZZERESCHI, D.; RUGHETTI, A.; CERETTA, S.; ZANNONI, A.; RAHIMI, H.; MOIOLI, B.; ROSSI, M.; NUTI, M.; ROSSI, G.; SEREN, E.; ALFANI, D.; CORTESINI, R.; FRATI, L. Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n. 1–2, p. 972–974, 1999.
- 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**, v. 64, n. 3, p. 284–291, 2003.

LAZZERESCHI, D.; FORNI, M.; CAPPELLO, F.; BACCI, M. L.; DI STEFANO, C.; MARFÉ, G.; GIANCOTTI, P.; RENZI, L.; WANG, H. J.; ROSSI, M.; DELLA CASA, G.; PRETAGOSTINI, R.; FRATI, G.; BRUZZONE, P.; STASSI, G.; STOPPACCIARO, A.; TURCHI, V.; CORTESINI, R.; SINIBALDI, P.; FRATI, L.; LAVITRANO, M. Efficiency of transgenesis using sperm-mediated gene transfer: Generation of hDAF transgenic pigs. **Transplantation Proceedings**, v. 32, n. 5, p. 892–894, 2000.

LI, Q.; WEI, H.; GUO, Y.; LI, Y.; ZHAO, R.; MA, Y.; YU, Z.; TANG, B.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LI, N. Production of human lysozyme-transgenic cloned porcine embryos by somatic nuclear transfer. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 6, p. 699–704, 2009.

LÓPEZ-SAUCEDO, J.; PARAMIO-NIETO, M. T.; FIERRO, R.; PIÑA-AGUILAR, R. E. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 133, n. 3–4, p. 129–138, 2012.

MARQUES, M. G.; NASCIMENTO, A. B.; GERGER, R. P. D. C.; GONÇALVES, J. S. D. A.; COUTINHO, A. R. D. S.; SIMÕES, R.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A. Effect of culture media on porcine embryos produced by in vitro fertilization or parthenogenetic activation after oocyte maturation with cycloheximide. **Zygote**, v. 19, n. 4, p. 331–7, 2011.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M. Use of chromatin stability assay , mitochondrial stain JC-1 , and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**. v. 84, p. 121–133, 2004.

NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M.; TRONO, D. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. **SCIENCE**. v. 9, n. 13, [s.d.]

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic livestock: Premises and promises. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 277–293, 2000.

ODDI, S.; BERNABÒ, N.; DI TOMMASO, M.; ANGELUCCI, C. B.; BISICCHIA, E.; MATTIOLI, M.; MACCARRONE, M. DNA uptake in swine sperm: Effect of plasmid topology and methyl-beta-cyclodextrin-mediated cholesterol depletion. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 12, p. 853–860, 2012.

OTTAVIANI, D.; LEVER, E.; MITTER, R.; JONES, T.; FORSHEW, T.; CHRISTOVA, R.; TOMAZOU, E. M.; RAKYAN, V. K.; KRAWETZ, S. A.; PLATTS, A. E.; SEGARANE, B.; BECK, S.; SHEER, D. Reconfiguration of genomic anchors upon transcriptional activation of the human major histocompatibility complex. **Genome Research**, p. 1–8, 2008.

PARK, J. K.; LEE, Y. K.; LEE, P.; CHUNG, H. J.; KIM, S.; LEE, H. G.; SEO, M. K.; HAN, J. H.; PARK, C. G.; KIM, H. T.; KIM, Y. K.; MIN, K. S.; KIM, J. H.; LEE, H. T.; CHANG, W. K. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 3, p. 362–371, 2006.

PEREYRA-BONNET, F.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; OLIVERA, R.; JARAZO, J.; VICHERA, G.; GIBBONS, A.; SALAMONE, D. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 7, p. 741–749, 2008.

PINKERT, C. A. Engenharia Genética em Animais Domésticos, in: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
PRAMOD, K.; KUMAR, R.; MITRA, A. Transgenic expression of green fluorescent protein in caprine embryos produced through electroporation-aided sperm-mediated gene transfer. **Gene**, v.576, p.505–511, 2015.

RESINA, S., PREVOT, P. & THIERRY, A. R. Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. **Plos One**, v.4, n.6, 2009.

RIETH, A.; POTHIER, F.; SIRARD, M. A. 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, n. 4, p. 338–345, 2000.

ROBINSON, K. O.; FERGUSON, H. J.; COBEY, S.; VAESSIN, H.; SMITH, B. H. Sperm-mediated transformation of the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 6, p. 625–634, 2000.

ROTTMAN, O. J.; ANTES, R.; HÖFER, P.; MAIERHOFER, G. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. v. 109, p. 64–70, 1992.

Saito, M.; Saitoh H. Labeling of Polyethylenimine with Fluorescent Dye to Image Nucleus, Nucleolus , and Chromosomes in Digitonin-Permeabilized HeLa Cells. **Bioscience. Biotechnology. Biochemistry**. n.76, v.9, 1777–1780, 2012

SATO, M.; TANIGAWA, M.; KIKUCHI, N.; NAKAMURA, S.; KIMURA, M. Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation. **Genesis**, v. 35, n. 3, p. 169–174, 2003.

SCHACKMANN, R. W.; CHRISTEN, R.; SHAPIRO, B. M. Membrane potential depolarization and increased intracellular pH accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 10, p. 6066–6070, 1981.

SCIAMANNA, I.; SUPERIORE, I.; UNIVERSIT, M.; PITMAN, C.; NATURE, H.; CORPORATION, T.; SPADAFORA, C.; NATIONAL, I. Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.312, n.4, p.1039–1046, 2003.

SCOFIELD, V. L.; SCHLUMPBERGER, J. M.; WEST, L. a; WEISSMAN, I. L. Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system. **Nature**, v. 295, p. 499–502, 1982.

SHEN, W.; LI, L.; PAN, Q.; MIN, L.; DONG, H.; DENG, J. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 5, p. 589–594, 2006.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MILAZZOTTO, M. P.; NICACIO, A. C.; BARROS, F. R. O. de; GONÇALVES, J. S. D. A.; MARQUES, M. G.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Comparison of different methods for exogenous DNA uptake by bovine spermatozoa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 78, 2015.

SMITH, K. R. Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human GermLine. **International Journal of Medical Sciences**, n.1, p.76–91. 2004.

TIZARD, Ian R. **Imunologia veterinária**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 551p.
TOMKINS, P. T.; HOUGHTON, J. A. The rapid induction of the acrosome reaction of human spermatozoa by electropermeabilization. **Fertil Steril**, v. 50, n. 2, p. 329–336, 1988.

TSAI, H. Electroporated Sperm Mediation of a GeneTransfer System for Finfish and Shellfish. **Molecular Reproduction and Development** v.56, p.281–284, 2000.

VARGIOLU, A.; MANZINI, S.; DE CECCO, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; GALEATI, G.; CERRITO, M. G.; BUSNELLI, M.; LAVITRANO, M.; GIOVANNONI, R. In vitro production of multigene transgenic blastocysts via sperm-mediated gene transfer allows rapid screening of constructs to be used in xenotransplantation experiments. **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 6, p. 2142–2145, 2010.

WAKEFIELD P, MURRAY E, MOSKA N, MATSON P. A Sperm Chromatin Structure Assay (sCSA): Background Analysis Of Azoospermic Semen, Validity Of Snap Freezing Semen Prior To Assay, And The Between-ejaculate Variability Seen With Donors. **WebmedCentral REPRODUCTION**, p. 1–8, 2010.

WALL, R. J. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. **Theriogenology**, v.45, p.57-66, 1996.

WALL, R. J., et al.,. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology**, v.23, n.4, p.445–451. 2005.

WANG, L.; FAN, J.; YU, M.; ZHENG, S.; ZHAO, Y. Association of goat (*Capra hircus*) CD4 gene exon 6 polymorphisms with ability of sperm internalizing exogenous DNA. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1621–1628, 2011.

WHITELAW, C. B. A.; FARINI, E.; WEBSTER, J. The changing role of cell culture in the generation of transgenic livestock. **Cytotechnology**, v.31, p.3–8, 1999.

WHITELAW, C. B. A.; RADCLIFFE, P. A.; RITCHIE, W. A.; CARLISLE, A.; ELLARD, F. M.; PENA, R. N.; ROWE, J.; CLARK, A. J.; KING, T. J.; MITROPHANOUS, K. A. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. **FEBS Letters**, v. 571, n. 1–3, p. 233–236, 2004.

WU, Z.; XU, Z.; ZOU, X.; ZENG, F.; SHI, J.; LIU, D.; URSCHITZ, J.; MOISYADI, S.; LI, Z. Pig transgenesis by piggyBac transposition in combination with somatic cell nuclear transfer. **Transgenic Research**, v. 22, 2013.

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**, 1995.

ZANIBONI, A.; SPINACI, M.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; FORNI, M.; BACCI, M. L. X and Y chromosome-bearing spermatozoa are equally able to uptake and internalize exogenous DNA by sperm-mediated gene transfer in swine. **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 1–3, 2016.

ZHANG, X.; PIEDRAHITA, J. A. Advances in the Generation of Transgenic Domestic Species via Somatic Cell Nuclear Transfer. In: Cibelli, J. et al., **Principles of Cloning**, 2 ed. Academic Press:San Diego, 2014, 572 p.

ZHANG, Y.; XI, Q.; DING, J.; CAI, W.; MENG, F.; ZHOU, J.; LI, H.; JIANG, Q.; SHU, G.; WANG, S.; ZHU, X.; GAO, P.; WU, Z. Production of transgenic pigs mediated by pseudotyped lentivirus and sperm. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

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

ANEXOS

Anexo A: Meios utilizados na polifecção

PBS

Componentes	Empresa	Código	Quantidade (molar)
NaCl	Sigma	S5886	5M
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655	1M
K ₂ HPO ₄	Sigma	P3786	1M

Polietilenoimina 20mg/mL

Componentes	Empresa	Código	Quantidade (molar)
NaCl	Sigma	S5886	0,3305
KCl	Sigma	P5495	0,0112

Anexo B: Meios utilizados na eletroporação

Meio de Fecundação (Modified Tyrodes Buffered Medium)

Componentes	Empresa	Código	Quantidade (molar)
NaCl	Sigma	S5886	0,3305
KCl	Sigma	P5495	0,0112
Glicose	Sigma	G1514	0,0990
Tris	Sigma	T6791	0,1214
CaCl ₂	Sigma	C7902	0,0551
BSA FAF	Sigma	A6003	0,0200

Anexo C: Meios utilizados na análise da viabilidade espermática

Solução de Laranja de Acridina (ESTOQUE)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Laranja de Acridina	Sigma	A-6014	60µg
Agua destila q.s.p.			10 mL

Solução de Laranja de Acridina (USO)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Ácido cítrico	Sigma	C1909	2,52g
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S-5136	3,408g
EDTA	Sigma	E-5134	0,04466g
NaCL	Sigma	S-5886	1,05192g
L.A. estoque	-	-	720µL
Agua destila q.s.p.			120mL
pH			6,0

Solução de detergente ácida

Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
HCl 0,08 M	Merk	K24537117	0,3
NaCl 0,15 M	Sigma	S-5886	2,4
Triton x-100 0,1%	Sigma	x-100	2,63
Agua destila q.s.p.			300 mL
pH			1,2

Anexo D: Soluções utilizadas para a FISH

TE Buffer (Diluição das sondas p/ FISH)

Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Tris 10mM			10mL
EDTA 1mM			2mL

SSC Buffer 6X

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
NaCl	Sigma	S-5886	0,9M
Citrato Trissódico			0,09M

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH ou HCl. Autoclavar a solução e armazená-la à temperatura ambiente.

DTT solução

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
1,4-Ditiotreitol	Ludwig Biotec	-	0,02M
H ₂ O Ultrapura q.s.p.	estéril -	-	10 mL

Dissolver completamente; Pré-umedecer um filtro de 0,22µm, utilizando entre 5 e 0 mL de H₂O estéril e descartando a água; Aliquotar, em microtubos de 2 mL e armazenar a -20°C; A solução pode ser armazenada por até um ano.

Mistura para Hibridização

Reagente	Fabricante	Catálogo	Concentração
Formamide	Sigma	F9037	50%
Sulfato de Dextrano 50%	Sigma	D8906	10%
SSC (20X)		-	10 µL
H ₂ O			2 µL

Fazer 100 µL da mistura para cada lâmina

Suínos transgênicos são criados para várias finalidades, e podem ser obtidos por várias metodologias, porém, devido a sua simplicidade e baixo custo, a SMGT apresenta-se como uma metodologia bastante promissora. Para aumentar a eficiência desta técnica, em outras espécies são usados métodos químicos, como a polifecção e físicos, como a eletroporação, que possibilitam aos espermatozoides captarem maiores quantidades de eDNA, mas nenhum destes está padronizado para suínos. O objetivo deste estudo foi otimizar protocolos para o uso da polifecção utilizando polietilenoimina e da eletroporação na transfecção de espermatozoides suínos e definir qual destes métodos é o mais eficiente. Avaliou-se também a viabilidade celular após a transfecção por cada um dos métodos, utilizando-se a citometria de fluxo. Para as transfecções utilizou-se o plasmídeo pmhyGENIE-5. Para a eletroporação, o protocolo utilizando 500 volts, 500 μ s e 2 pulsos obteve a melhor viabilidade celular e taxa de transfecção de 36,7% e para a polifecção o protocolo utilizando 0,5mg/mL, com incubação de 10 minutos pulsos obteve a melhor viabilidade celular e taxa de transfecção de 76,8%. O método de incubação, que foi utilizado como controle demonstrou uma taxa de transfecção de 17,80% \pm 1,07. A eletroporação teve 36,70% \pm 2,78 de eficiência, enquanto a taxa de transfecção da PEI foi de 76,8% \pm 3,09, demonstrando que estes métodos foram mais eficientes que a incubação.

Orientador: Carlos André da Veiga Lima-Rosa

Coorientadora: Mariana Groke Marques