

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) APÓS ELETROPORAÇÃO CAPILAR PARA SMGT

HADASSA GABRIELA ORTIZ¹; LARISSA OLIVEIRA DANELUZ²; EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN²; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²; LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES²; VINÍCIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – hortizhadassa@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - larissa.daneluz@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos, algumas técnicas alternativas de transgênese, para a criação de animais geneticamente modificados, têm sido desenvolvidas. A Transferência Gênica Mediada por Espermatozoides (SMGT) é uma técnica que explora a capacidade natural das células espermáticas de incorporarem DNA exógeno (KUMAR et al., 2016).

Alguns estudos já pontuaram determinadas vantagens na utilização desta técnica em espécies aquáticas. Contudo, a captação do DNA exógeno pelos espermatozoides ainda é insuficiente para garantir uma boa eficiência para SMGT. Uma alternativa para solucionar este problema é a utilização da eletroporação, a qual se utiliza da aplicação de um campo elétrico a fim de aumentar a permeabilidade da membrana, sendo classificada como um método físico. Como resultado disso, tem-se a formação de poros temporários na membrana, fazendo com que seja possível o influxo de moléculas (DE VRY et al., 2010).

A eletroporação capilar é uma variação da eletroporação convencional e se utiliza de ponteiras contendo eletrodos de ouro como uma câmara de eletroporação. Quando comparada ao método convencional, a eletroporação capilar apresenta maior eficiência na transfecção e redução nos danos celulares além de ser uma técnica rápida de transferência gênica (KIM et al., 2008).

Percebendo-se a necessidade do aprimoramento da técnica de SMGT e das vantagens da eletroporação capilar, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma metodologia de eletroporação que visa reduzir os danos decorrentes do método físico, a fim de utilizar as células espermáticas transfectadas em SMGT posteriormente para a produção de animais transgênicos.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da técnica desenvolvida nos parâmetros cinéticos das células espermáticas de *Danio rerio*.

2. METODOLOGIA

As células espermáticas de *Danio rerio* (zebrafish) foram coletadas e ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células em 10 μ L. O DNA exógeno (fragmento de 546pb do vetor pEGFP-N1) foi amplificado e conjugado ao fluoróforo Cianina 3 (Cy3) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para a técnica de eletroporação capilar utilizou-se o equipamento Neon Transfection System (Invitrogen, USA) e manteve-se constante o número de

pulsos (1), tempo (1 ms) e o volume das amostras a fim de avaliar o efeito dos diferentes valores de tensão (500 V, 750 V, 1000 V, 1250 V e 1500 V). Como grupo controle, foram utilizadas células espermáticas que não foram submetidas à eletroporação. Para evitar a interferência externa de DNA exógeno aderido à parte externa das células, as amostras foram tratadas com DNase I.

Para as análises dos parâmetros cinéticos, foram avaliadas 5 ativações por amostras em 1-2 campos por ativação durante 10 s. Cada amostra foi diluída na proporção de 1 μ L de sêmen para 4 μ L de Água Milli-Q e acondicionadas a 4 °C para que pudesse ser analisada em lâminas utilizando o sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyses) associado ao microscópio óptico Axio Scope A1 ® (Zeiss, Germany). Os parâmetros observados foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e tempo de motilidade (segundos). A análise estatística dos parâmetros cinéticos foi feita utilizando-se two-way ANOVA seguidos de teste de Tukey $P < 0.05$ para significância estatística.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Devido à utilização de animais, a metodologia utilizada neste estudo foi avaliada e aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPEL, processo sob número 7836.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à ativação dos espermatozóides, a técnica não demonstrou interferências, visto que todos os espermatozóides adquiriram motilidade ao entrar em contato com a água. Além do mais, a presença do DNA exógeno não afetou as motilidades progressiva e total ($P > 0.05$). A motilidade total dos grupos controle com e sem DNA exógeno foram $72.2\% \pm 1.36$ e $65.2\% \pm 1.4$, respectivamente.

Quanto ao efeito das tensões aplicadas foi possível observar, de forma geral, uma diminuição na motilidade total (Figura 1). Entretanto, para as menores tensões (500 V e 700 V) essa diminuição foi menor ($P < 0.05$), sendo $64.7\% \pm 1.61$ (500 V) e $62.6\% \pm 1.99$ (750 V) sem DNA exógeno e $63.5\% \pm 1.75$ (500 V) e $61.6\% \pm 1.64$ (750 V) com DNA exógeno. No caso da eletroporação com DNA exógeno em baixas tensões, as diferenças na motilidade total não foram significativas em relação ao controle. Esses resultados contrastam com estudos anteriores usando eletroporação convencional em que baixas voltagens (200 V a 750 V) demonstraram efeitos negativos visíveis na motilidade espermática (MÜLLER et al., 1992; SIN et al., 1993; DEWI et al., 2010). Isso sugere que nossa metodologia oferece vantagens em relação a eletroporação convencional.

A motilidade progressiva (Figura 2) em baixas tensões (500 e 750 V) foi igual, estatisticamente, quando comparadas com o grupo controle com DNA ($P > 0.05$). Enquanto que os espermatozóides submetidos a altas voltagens (1250 e 1500 V) demonstraram uma diminuição na motilidade progressiva ($P < 0.05$) quando comparados ao grupo controle.

O tempo de motilidade sofreu uma redução significativa ($P < 0.05$) nas maiores tensões (1250 V e 1500 V) quando comparado com o grupo controle sem DNA exógeno (Figura 3). Todavia, o grupo controle incubado com DNA exógeno apresentou uma redução significativa no tempo de motilidade ($P < 0.05$) ao ser comparado com os demais grupos experimentais.

Em suma, os resultados obtidos foram promissores e demonstraram que as baixas tensões (500 V e 750 V) seriam consideradas as mais adequadas para as

células espermáticas de peixes, visto que nessas tensões houveram menos danos aos parâmetros espermáticos. Apesar disso, também houve uma diminuição na motilidade total, fazendo com que sejam necessários mais estudos acerca do protocolo de transfecção.

Figura 1 - Motilidade total

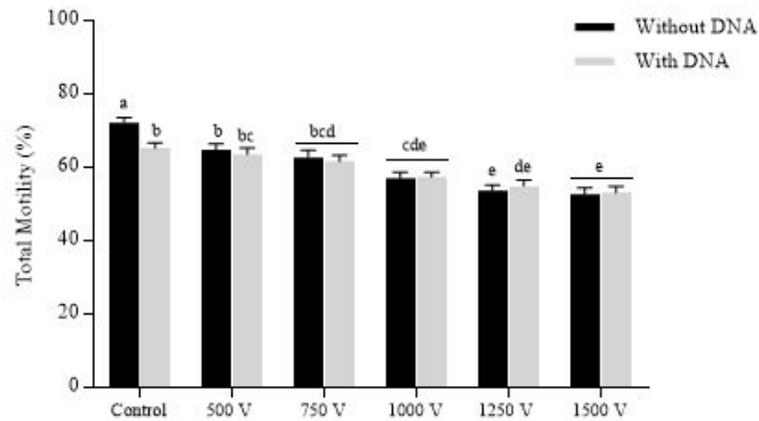


Figura 2 - Motilidade progressiva

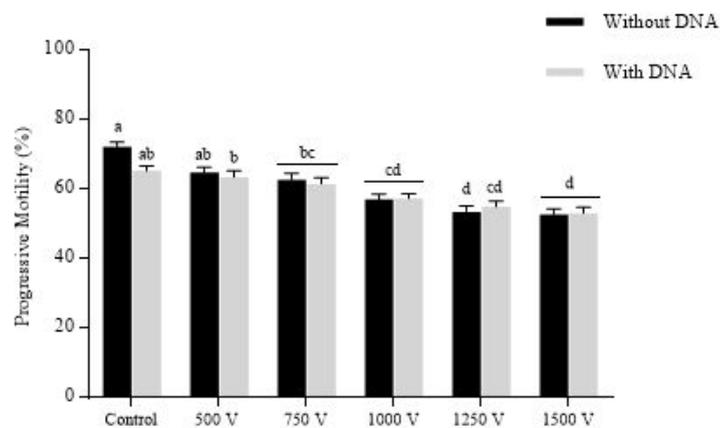
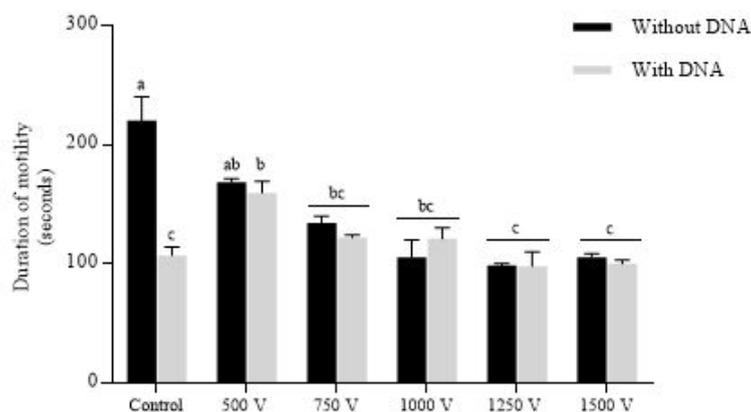


Figura 3 - Tempo de motilidade



4. CONCLUSÕES

A técnica desenvolvida mostrou-se promissora para posteriores utilizações na produção de peixes transgênicos. Entretanto, são necessários mais estudos a fim de verificar se a diminuição na motilidade espermática pode ser um fator interferente nas taxas de fertilização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KUMAR PRAMOD R, KUMAR R, MITRA A. Transgenic expression of green fluorescent protein in caprine embryos produced through electroporation-aided sperm-mediated gene transfer. **Gene** 2016;576:505–11. doi:10.1016/j.gene.2015.10.066.

DE VRY J, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ P, LOSEN M, TEMEL Y, STECKLER T, STEINBUSCH HWM, et al. In vivo electroporation of the central nervous system: A non-viral approach for targeted gene delivery. **Prog Neurobiol** 2010;92:227–44. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.10.001.

KIM JA, Cho K, Shin MS, et al. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. **Biosensors and Bioelectronics**. 2008;23(9):1353-1360. doi:10.1016/j.bios.2007.12.009

MÜLLER F, Ivics Z, Erdélyi F, et al. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. **Mol Marine Biol Biotechnol**. 1992;1(4-5):276-281.

SIN FYT, Bartley AL, Walker' SP, et al. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporation sperm in the presence of pRSV-1acZ DNA. 1993:13. 21.

DEWli RRSPS, Alimuddin A, Sudrajat AO, Sumantadinata K, Sularto S. OPTIMAL ELECTROPORATION CONDITION FOR SPERM MEDIATED GENE TRANSFER IN STRIPPED CATFISH (*Pangasionodon hypophthalmus*). **Indonesian Aquaculture Journal**. 2010;5(1):1. doi:10.15578/iaj.5.1.2010.1-10