

MÉTODO DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA EXÓGENO INTERNALIZADO POR CÉLULAS

EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN¹; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA
MARTINS²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; EDUARDO BIERHALS
BLÖDORN²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – edu.ndell@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – amandaweege98@gmail.com; williamwwe@yahoo.com.br;
edu.bbldorn@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de manipulação genética permitem que uma molécula de DNA exógeno seja introduzida em células eucarióticas através de um processo denominado de transfecção (DOMINGUES, et al., 2017). Os genes contidos no DNA exógeno podem ser expressos e proteínas biologicamente ativas podem ser sintetizadas, em linhagens celulares eucarióticas. O uso de gametas submetidos à transfecção de DNA exógeno para a produção em massa de animais transgênicos tem recebido atenção (CAMPOS, et al., 2011; JIN, et al., 2016; HAN, J. W.; YOON, Y., 2011; REN, et al., 2011; LAIBLE, et al., 2015). Um dos métodos mais utilizados para a avaliação da transfecção é o emprego de DNA contendo o gene da proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), a qual acaba auxiliando como marcador indireto da internalização do gene de interesse, também contido no constructo (AMARAL, et al., 2011; TASIC, et al., 2011). No entanto, linhagens de células germinativas, como os espermatozoides, possuem uma maquinaria deficiente, a qual não permite a expressão do gene da GFP, impossibilitando a análise da eficiência do processo de internalização de DNA exógeno neste tipo celular sem uma etapa de fertilização *in vitro* (LAVITRANO, et al., 2005; ARIAS, et al., 2017;). Dentre as tecnologias disponíveis para análise de uma grande quantidade de células em um curto período, a citometria de fluxo do tipo FACS (separador celular ativado por fluorescência) destaca-se por ser de caráter multiparamétrico, realizar análises de forma automatizada e a diferenciação celular individual pelo emprego prévio de fluorocromos. Se observou no estado da técnica uma carência de metodologias para avaliação da eficiência do processo de transfecção de DNA exógeno em células germinativas de uma forma rápida e acurada. Sendo assim, buscou-se o desenvolvimento de uma tecnologia que permitisse a avaliação da quantificação do número de células carreadoras de DNA exógeno após incubação, para a sua posterior utilização.

2. METODOLOGIA

O DNA exógeno foi preparado utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores associados ao fluoróforo Cianina 3 (Cy3). Em seguida, para confirmar a amplificação, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose. Após a confirmação da banda no gel, a amostra de DNA exógeno foi quantificada por espectrofotometria de luz UV, para padronização da concentração de DNA a ser utilizada durante a etapa de transfecção. Posteriormente, o DNA exógeno foi colocado em contato com as células espermáticas durante um período de incubação previamente testado. Em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens e um tratamento utilizando a

enzima DNase, para a remoção do DNA exógeno não internalizado. Após a lavagem, as células foram submetidas a análise por microscopia confocal de fluorescência, para a visualização do DNA exógeno internalizado, e submetidas a análise por citometria, para a detecção e quantificação das células com DNA internalizado. Os dados de internalização do DNA exógeno foram analisados estatisticamente por análise de variância simples (*One-way ANOVA*) seguido de pós teste de Tukey, com nível de significância estatística de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da tecnologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa foi possível uma análise mais rápida e precisa da eficiência da transfecção de DNA exógeno em espermatozoides, inclusive permitindo a avaliação concomitante de outros parâmetros de qualidade celular através da citometria de fluxo e microscopia confocal. Dentre os trabalhos desenvolvidos até o presente momento em que a tecnologia aqui apresentada foi empregada, destaca-se o trabalho de Domingues e colaboradores (2017), onde estes elucidaram o papel da proteína CD4, presente naturalmente na membrana espermática, durante o processo de internalização do DNA exógeno em espermatozoides bovinos (Figura 1).

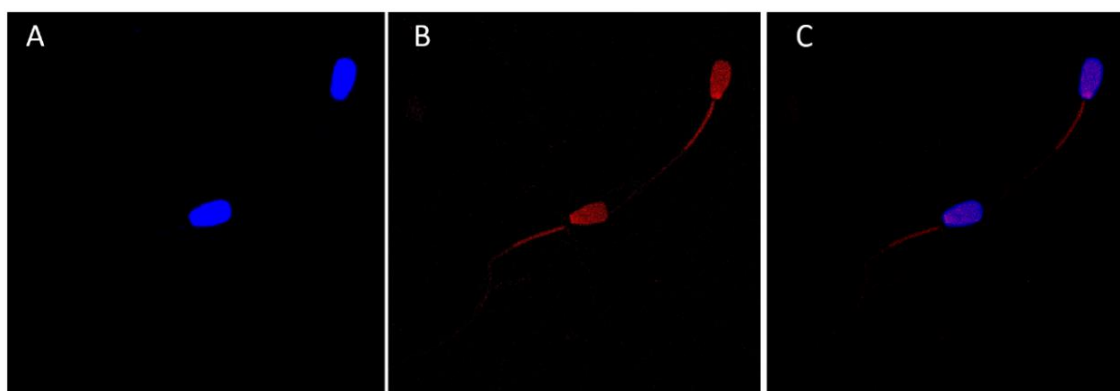


Figura 1 – Imagens de espermatozoides bovinos capturadas em microscopia confocal de fluorescência. (A) DNA genômico marcado com corante comercial *Hoescht*, (B) DNA exógeno internalizado marcado com Cy3 emitindo fluorescência no comprimento de onda de 590nm e (C) Sobreposição de ambas as imagens.

Além disso, através da tecnologia de detecção e quantificação de DNA exógeno internalizado, foi possível evidenciar uma menor eficiência na transfecção quando utilizadas células espermáticas previamente sexadas (Figura 2).

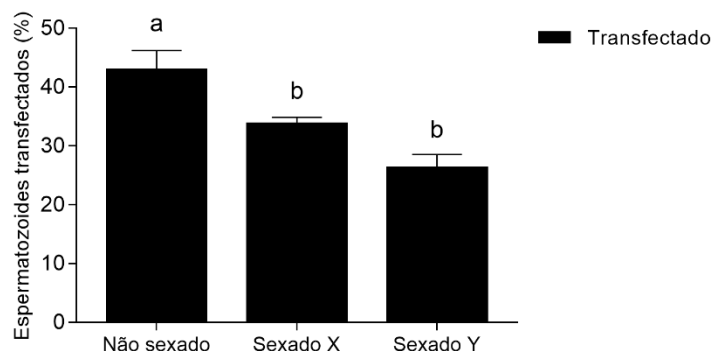


Figura 2 – Gráfico demonstrando a porcentagem de células transfectadas com DNA exógeno marcado nos grupos de sêmen não sexado, sexado fêmea (X) e sexado macho (Y). Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de $p < 0,05$.

Concomitante à quantificação do número de espermatozoides carregando o DNA exógeno, foi também possível a análise de parâmetros de motilidade, cinética espermática e viabilidade celular, uma vez que a célula não sofreu danos durante a análise por citometria de fluxo.

4. CONCLUSÕES

Através do presente estudo foi possível o desenvolvimento de uma patente de inovação relacionada à tecnologia descrita no presente trabalho, a qual apresenta caráter inovador no âmbito de detecção e quantificação de DNA exógeno internalizado por células. A tecnologia está disponível para consulta no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob número de registro BR1020160186188 e apta para a transferência tecnológica para o setor comercial em biotecnologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOMINGUES, William Borges et al. Flow cytometric sex sorting affects CD4 membrane distribution and binding of exogenous DNA on bovine sperm cells. **Zygote**, v. 25, n. 4, p. 519-528, 2017.
- LAIBLE, Götz; WEI, Jingwei; WAGNER, Stefan. Improving livestock for agriculture—technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. **Biotechnology journal**, v. 10, n. 1, p. 109-120, 2015.
- TASIC, Bosiljka et al. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 19, p. 7902-7907, 2011.
- HAN, Ji Woong; YOON, Young-sup. Induced pluripotent stem cells: emerging techniques for nuclear reprogramming. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 7, p. 1799-1820, 2011.
- LAVITRANO, Marialuisa et al. Sperm-mediated gene transfer. **Reproduction, fertility and development**, v. 18, n. 2, p. 19-23, 2005.
- JIN, Zhen et al. Efficient gene knockdown in mouse oocytes through peptide nanoparticle-mediated siRNA transfection. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0150462, 2016.

ARIAS, María Elena et al. Effect of transfection and co-incubation of bovine sperm with exogenous DNA on sperm quality and functional parameters for its use in sperm-mediated gene transfer. **Zygote**, v. 25, n. 1, p. 85-97, 2017.

CAMPOS, Vinicius F. et al. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1476-1481, 2011.

AMARAL, Marta G. et al. Testis-mediated gene transfer in mice: comparison of transfection reagents regarding transgene transmission and testicular damage. **Biological research**, v. 44, n. 3, p. 229-234, 2011.