

EFEITOS DA TRANSFECÇÃO DE DNA EXÓGENO SOBRE A FISIOLOGIA ESPERMÁTICA

WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²;
EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN³; HADASSA GABRIELA ORTIZ⁴; LAÍS DOS
SANTOS GONÇALVES⁵; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁶

¹ Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, PPGB, UFPel – william.borges.domingues@gmail.com

² Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, GBiotec, UFPel - amandaweege98@gmail.com

³ Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, GBiotec, UFPel - edu.ndell@gmail.com

⁴ Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, GBiotec, UFPel - hortizhadassa@gmail.com

⁵ Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, GBiotec, UFPel - laisdssantosg@gmail.com

⁶ Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, PPGB, UFPel - fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A transfecção é um procedimento que introduz ácidos nucleicos exógenos para produzir células geneticamente modificadas. Uma das principais aplicações dos métodos de transfecção está no campo de pesquisa em Biotecnologia Animal (Stewart et al., 2016). Os animais geneticamente modificados podem ser usados para elucidar mecanismos moleculares de processos patológicos relevantes, aumentar a produção animal, funcionar como biorreatores, entre outras aplicações.

Quando a transfecção de DNA exógeno é aplicada às células espermáticas para produzir embriões transgênicos, essa técnica é conhecida como Transferência Gênica Mediada por Espermatozoides (SMGT). A SMGT baseia-se na capacidade natural das células espermáticas de interagir, internalizar e transferir DNA exógeno para um óvulo durante o processo de fertilização (Smith et al., 2012). No entanto, essa técnica ainda possui uma eficiência muito limitada, principalmente devido às baixas taxas de internalização, e por outros fatores biológicos ainda não totalmente elucidados que levam a uma diminuição da qualidade espermática.

Buscando a otimização desta técnica, um dos métodos empregados tem sido o uso de nanoestruturas para melhor interação do DNA exógeno com as células espermáticas (Campos et al., 2011). Dendrímeros catiônicos carregados positivamente facilitam a interação de biomoléculas exógenas e a membrana celular da célula-alvo (Movassaghian et al., 2011). Acreditava-se que características intrínsecas dos reagentes de transfecção ou utilização de grandes quantidades de DNA exógeno poderiam desencadear a ativação das endonucleases, resultando na degradação não somente do DNA exógeno, mas também do próprio DNA genômico espermático. Esse fato poderia explicar as diferenças na repetibilidade e eficiência da transfecção. No entanto, em estudos anteriores, como o de Feitosa e colaboradores (2010), foi demonstrado que a internalização de DNA exógeno não induz a fragmentação do genoma espermático em bovinos.

Portanto, nossa hipótese é de que o dano causado pela transfecção é pronunciado no epigenoma do espermatозоide, especificamente sobre os microRNAs desta célula. MicroRNAs são pequenas moléculas de 22 a 24 nucleotídeos que formam estruturas parcialmente complementares aos seus genes-alvo, levando à repressão translacional destes (Herkenhoff et al., 2018). Apesar de avanços na área de Biotecnologia Animal, os supostos efeitos prejudiciais dos métodos de transfecção na população de microRNAs

espermáticos e suas consequências para a qualidade destas células ainda não foram elucidados.

Assim, o presente estudo tem como objetivo identificar os efeitos da transfecção de DNA exógeno associado a nanoestrutura catiônica sobre os parâmetros de motilidade e expressão de microRNAs em espermatozoides bovinos.

2. METODOLOGIA

Alíquotas de 100×10^6 células espermáticas foram adicionadas em cada tratamento e usadas nas análises subsequentes. Os grupos experimentais foram definidos de acordo com o método de transfecção realizado: incubação com ou sem DNA exógeno livre; e transfecção mediada por dendrímero catiônico com ou sem DNA exógeno.

A análise dos efeitos dos diferentes métodos de transfecção sobre a motilidade espermática foi realizada através do Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (AndroVision®, Minitübe, Alemanha). Após a extração do RNA total espermático, o sequenciamento dos microRNAs foi feito na plataforma MiSeq (Illumina, EUA). Posteriormente, A expressão diferencial dos microRNAs entre os grupos foi analisada com o auxílio do pacote edgeR, seguido da predição *in silico* dos genes alvos e vias moleculares afetadas.

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos parâmetros de motilidade foram analisadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. Todos os dados estão demonstrados como média \pm erro padrão da média e valores de P abaixo de 0,05 foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas em três repetições independentes após 30 minutos de incubação das células.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise computadorizada da motilidade espermática revelou que a internalização do DNA exógeno livre nos espermatozoides bovinos não alterou seus parâmetros cinéticos (Fig. 1A e 1B). Importante ressaltar que a manutenção da normalidade dos parâmetros cinéticos é uma das principais características responsáveis pelo papel dos espermatozoides no processo de fertilização do óocito.

Observamos, no entanto, que os espermatozoides transfectados com dendrímero catiônico apresentaram uma diminuição significativa na motilidade total (Fig. 1A, $P<0,05$) e progressiva (Fig. 1B, $P<0,05$), em comparação com os grupos controles.

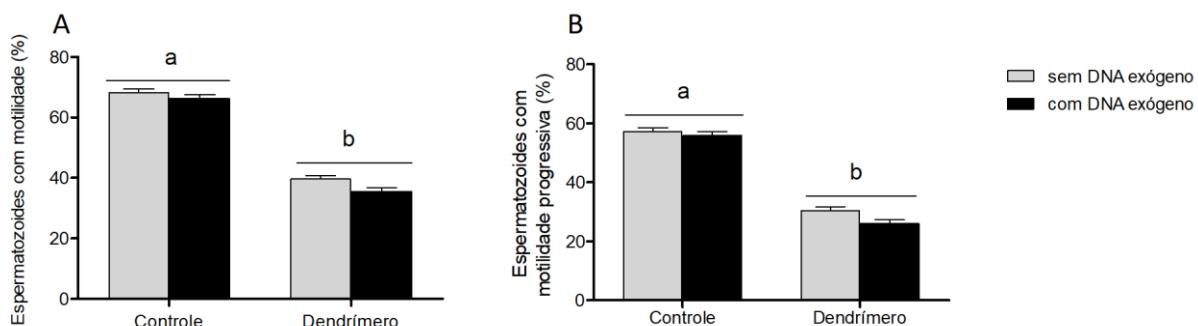


Figura 1. Motilidade total (A) e progressiva (B) de espermatozoides bovinos transfectados com DNA exógeno. Letras diferentes indicam diferença significativa

entre os grupos experimentais ao nível de $P < 0,05$. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $N = 3$.

Embora a interação de nanoestruturas catiônicas com a membrana seja essencial para uma bem-sucedida transfecção de DNA exógeno, grandes rupturas podem causar danos severos a toda a membrana (Shahbazau et al., 2010). Isso, por sua vez, é seguido por um influxo de fluido extracelular e início de uma cascata de eventos apoptóticos, levando a diminuição do número de espermatozoides viáveis e móveis.

Por meio de Sequenciamento de Nova Geração, observamos que o método de transfecção de DNA exógeno mediado por dendrímero, quando comparado ao controle, induziu o aumento da expressão de oito microRNAs e a diminuição da expressão de um único microRNA ($p < 0,01$ e FDR $< 0,03$).

Através de ferramentas de predição *in silico*, revelamos que o conjunto de microRNAs expressos diferencialmente têm como alvos cerca de 4800 genes, sendo a maioria relacionados à vias moleculares diretamente envolvidas em potencial fertilizante e desenvolvimento embrionário (Alonso et al., 2017; Lucchesi et al., 2016), reforçando a hipótese de que fatores exógenos podem ter efeitos sobre o epigenoma, levando à modulação da expressão de microRNAs importantes não somente para o espermatozoide, mas também para o embrião gerado através de biotécnicas aplicadas à reprodução animal.

4. CONCLUSÕES

Em resumo, nossos resultados permitem concluir que a nanoestrutura catiônica utilizada leva à uma diminuição dos parâmetros de motilidade, e ainda, altera a expressão de importantes microRNAs relacionados à cinética e embriogênese, os quais podem vir a ser usados como biomarcadores moleculares da qualidade espermática.

Além disso, uma vez que existem vários genes-alvo preditos para os microRNAs infra e superexpressos identificados no presente estudo, investigações futuras devem se concentrar na elucidação do papel destes microRNAs sobre o posterior desenvolvimento de embriões bovinos transgênicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, C. A. I., Osycka-Salut, C. E., Castellano, L., Cesari, A., Di Siervi, N., Mutto, A. & Perez-Martinez, S. (2017). Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation in bovines. **Molecular Human Reproduction**, 23(8), 521-534.

Arias, M. E., Sánchez-Villalba, E., Delgado, A., & Felmer, R. (2017). 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**, 25(1), 85-97.

Campos, V. F., Komninou, E. R., Urtiaga, G., de Leon, P. M., Seixas, F. K., Dellagostin, O. A. & Collares, T. (2011). NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. **Theriogenology**, 75(8), 1476-1481.

Feitosa, W. B., Mendes, C. M., Milazzotto, M. P., Rocha, A. M., Martins, L. F., Simoes, R. & Assumpção, M. E. O. A. (2010). Exogenous DNA uptake by bovine spermatozoa does not induce DNA fragmentation. **Theriogenology**, 74(4), 563-568.

Herkenhoff, M. E., Oliveira, A. C., Nachtigall, P. G., Costa, J. M., Campos, V. F., Hilsdorf, A. W., & Pinhal, D. (2018). Fishing into the MicroRNA transcriptome. **Frontiers in Genetics**, 9, 88.

Kevin R. Smith. **Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies**. Reino Unido: Bentham Science, 2012.

Lucchesi, O., Ruete, M. C., Bustos, M. A., Quevedo, M. F., & Tomes, C. N. (2016). The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLC ϵ /IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1863(4), 544-561.

Movassaghian, S., Moghimi, H. R., Shirazi, F. H., & Torchilin, V. P. (2011). Dendosome-dendriplex inside liposomes: as a gene delivery system. **Journal of Drug Targeting**, 19(10), 925-932.

Sasaki, A., & Kinjo, M. (2010). Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties. **Journal of Controlled Release**, 143(1), 104-111.

Shahbazau, A., Isayenka, I., Kartel, N., Goncharova, N., Seviaryn, I., Kosmacheva, S., & Bryszewska, M. (2010). Transfection efficiencies of PAMAM dendrimers correlate inversely with their hydrophobicity. **International Journal of Pharmaceutics**, 383(1-2), 228-235.

Stewart, M. P., Sharei, A., Ding, X., Sahay, G., Langer, R., & Jensen, K. F. (2016). In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. **Nature**, 538(7624), 183.