

OTIMIZAÇÃO DO METODO DA POLIETILENOIMINA NA TRANSFECCÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

Zigomar da Silva¹, Andressa Pereira de Souza², Francisco Noé da Fonseca³,
Carlos André da Veiga Lima Rosa⁴, Mariana Groke Marques⁵

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveteriárias, zigomar@veterinario.med.br

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveteriárias

³Analista da Embrapa Suínos e Aves

⁴Docente da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ensino da região Sul

⁵Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: polietilenoimina, espermatozoide, transfecção.

INTRODUÇÃO

Suínos transgênicos são desenvolvidos várias finalidades. Devido a sua semelhança fisiológica e anatômica com a espécie humana, são utilizados na pesquisa biomédica, como biorreatores, modelos para estudos de doenças e como doadores de tecidos para xenotransplante (1, 2, 3). A transgenia também pode ser grande valiosa ferramenta para o melhoramento genético, pois pode-se alterar uma característica genética específica de forma dirigida (4). Para a geração de animais transgênicos é crucial a transfecção, ou seja, a inserção de DNA exógeno (eDNA) necessária em uma célula ou gameta, para a partir daí, gerar o animal transgênico. As metodologias de transfecção celular com a finalidade de gerar animais transgênicos são várias, porém a maioria delas são caras, pouco eficientes ou ambas. A polifecção é um método de transfecção celular que usa polímeros catiônicos como veiculadores de eDNA. Estes polímeros e o eDNA se unem formando um complexo denominado políplexo. Este políplexo interage eletricamente com a membrana celular, facilitando a entrada do eDNA na célula (6). A polietilenoimina, ou PEI, é um polímero catiônico utilizado na transfecção de diversos tipos celulares, porém, ainda não existem relatos do uso da PEI para a polifecção de espermatozoides suínos. Para que níveis satisfatórios de transfecção sejam alcançados, deve-se estabelecer qual a concentração de PEI é a mais adequada, além de qual o tempo de incubação necessário para este polímero ultrapassar a membrana citoplasmática do espermatozoide.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos. Inicialmente testou-se quatro diferentes concentrações, sendo 0,5 (C1), 1 (C2), 2 (C3) ou 4 (C4) mg/ml de PEI, marcada com a sonda FITC, incubando-se durante 10 minutos (0H), 2 (2H) e 4 (4H) horas. A conjugação da PEI ao FITC foi realizada semelhante ao descrito por Saito e Saitoh (2012) (8). Para as transfecções, utilizaram-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS para obtenção de amostras com 200µl e 2x10⁶ spzt/ml e compuseram os grupos experimentais, que foram transfectados conforme seu respectivo grupo. Após, analisou-se as amostras por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6), para mensuração da taxa de incorporação de PEI/FITC. Os dados gerados foram analisados estatisticamente e selecionados os dois melhores grupos para os melhores grupos para o segundo experimento. Caso não haja diferença estatística, serão escolhidos, por economia e facilidade de trabalho, os grupos com menor concentração ou menor tempo de incubação. Neste, foi analisada a viabilidade espermática dos dois grupos que tiveram a maior incorporação da PEI/FITC. Para isso, utilizaram-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS para obtenção de amostras com 200µl e 2x10⁶ spzt/ml, as quais foram transfectadas utilizando PEI, em concentração e por tempo conforme definido anteriormente. Após as transfecções, em cada amostra foi empregado-se as sondas FITC, PI, laranja de acridina e JC1, as quais, avaliam, respectivamente, a integridade de acrossoma (IA), de membrana (IM), de cromatina (IC) e potencial mitocondrial (PM). Os resultados destas avaliações são expressas em txas de lesão de acrossoma (LA), lesão de membrana citoplasmática (LMC), fragmentação de DNA (FDNA) e baixo potencial de membrana mitocondrial (bPMM) Então, analisou-se as amostras por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6), para mensuração das taxas de marcação por cada uma das sondas. Os dados gerados foram submetidos analisados estatisticamente, utilizando-se o PROC MIXED (SAS, versão 9.2 para Windows), com comparações utilizando o Teste Tukey, análise de interação entre as variáveis e nível de significância de 5% (p<0,05). Considerou-se como melhor protocolo para a transfecção de espermatozoides suínos, o grupo que apresentou a maior incorporação de PEI/FITC e ainda, obteve a melhor taxa de viabilidade espermática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto ao primeiro experimento não houve interação entre a concentração e o tempo de incubação da PEI/FITC (p= 0.7317). Quanto a concentração, não houve diferença entre os grupos. O grupo C1 teve uma taxa de incorporação de 93.05±0.37%, não diferindo do grupo C2 (93.83±0.37%) (p=0,4491), do grupo C3 (94.40±0.36%) (p=0.0515) e do grupo C4 (94.39±0,9%) (p=0.0682). O grupo C2 também não diferiu do grupo C3 (p=0.6939) ou do grupo C4 (p=0.7310). Ainda, os grupos C3 e C4 não diferiram entre

si ($p=1,0000$). Quanto ao tempo de incubação, houve diferença entre os grupos ($p<.0001$). O grupo 0H teve uma taxa de incorporação de PEI/FITC de $97.82\pm 0,32\%$, não diferindo do grupo 2H ($97.06\pm 0,32\%$) (0.4491), mas diferindo do grupo 4H ($86.89\pm 0,32\%$) ($p<.0001$). O grupo 4H também diferiu do grupo 2H ($p<.0001$), demonstrando, assim, uma pior performance. Quanto ao segundo experimento, as taxas de marcação com cada uma das sondas foram comparadas com as taxas de marcação de um grupo controle, ou seja, um grupo que não transfectados com PEI, mas em que empregou-se todas as sondas anteriormente citadas. A taxa de LA do grupo controle foi de $47,79 \pm 3,08$, não diferindo do grupo 0H ($58,58\pm 3,08$) ($p=0,0506$) ou do grupo 2H ($53,18\pm 3,08$) ($p=0,4429$). O grupo 0H e 2H não diferiram entre si ($p=0,4416$), demonstrando a transfecção pelo método da PEI não provoca aumento nos índices de LMC. A taxa de lesão de membrana 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 a transfecção pelo método da PEI provoca aumento nos índices de lesão de membrana plasmática, quando da incubação por 2 horas, em comparação com os demais grupos. A taxa de F DNA do grupo controle foi de $1,23\pm 0,65$, não diferindo do grupo 0H ($1,30\pm 0,65$) ($p=0,9968$) ou do grupo 2H ($2,05\pm 0,65$) ($p=0,06514$). O grupo 0H e 2H não diferiram entre si ($p=0,6979$), demonstrando que a transfecção utilizando PEI, não afetou os índices de integridade de cromatina. A taxa de bPMM do grupo controle foi de $6,59\pm 1,40$, não diferindo do grupo 0H ($10,68\pm 1,40$) ($p=0,1188$) ou do grupo 2H ($7,86\pm 1,40$) ($p=0,8008$). O grupo 0H e 2H não diferiram entre si ($p=0,3470$). Isso demonstra que a transfecção utilizando PEI, não afetou os índices de potencial de membrana mitocondrial.

CONCLUSÕES

A polietilenoimina mostrou-se capaz de transfectar espermatozoides suínos, em todas as concentrações utilizadas. Quanto ao tempo de incubação, 10 minutos mostrou-se um tempo satisfatório, em que a taxa de transfecção é satisfatória e a viabilidade espermática é mantida.

REFERÊNCIAS

1. WHITELAW, C. B. A., et al. **Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector**. FEBS Letters, v.571, p.233-236, 2004.
2. LI, Q., et al. **Production of human lysozyme-transgenic cloned porcine embryos by somatic nuclear transfer**. Prog. Nat. Sci., n.19, 699-704, 2009.
3. D'APICE e COWAN, 2009 D'APICE, A. J. F. e COWAN, P. J. **Xenotransplantation: The next generation of engineered animals**. Transpl. Immunol., v.21, p.111-115, 2009.
4. HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
5. TROS DE ILARDUYA C, Sun Y, DÜZGÜNES N. **Gene delivery by lipoplexes and polyplexes**. Eur J Pharm Sci. v. 40, n.3, p. 159-70. 2010.
6. HSU, C.Y.M.; ULUDAG, H. **A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine**. Nat. Protoc., v.7, n.5, p.935-945, 2012.
7. Saito M, Saitoh H. **Labeling of polyethylenimine with fluorescent dye to image nucleus, nucleolus, and chromosomes in digitonin-permeabilized HeLa cells**. Biosci Biotechnol Biochem n.76, v.9. p. 1777-80. 2012