

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

ICSI-NanoSMGT: Estabelecimento de metodologia de transfecção de DNA exógeno associado a nanoestruturas catiônicas em espermatozoides bovinos

William Borges Domingues

Pelotas, 2014

William Borges Domingues

ICSI-NanoSMGT: Estabelecimento de metodologia de transfecção de DNA exógeno associado a nanoestruturas catiônicas em espermatozoides bovinos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

D671i Domingues, William Borges

Icsi-nanosmgt: estabelecimento de metodologia de transfecção de dna exógeno associado a nanoestruturas catiônicas em espermatozoides bovinos / William Borges Domingues ; Vinicius Farias Campos, orientador. — Pelotas, 2014.

37 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Smgt. 2. Dendrímero. 3. Lipossoma. 4. Nanoestruturas catiônicas. 5. Nanotecnologia. I. Campos, Vinicius Farias, orient. II. Título.

CDD : 620.5

William Borges Domingues

ICSI-NanoSMGT: Estabelecimento de metodologia de transfecção de DNA exógeno associado a nanoestruturas catiônicas em espermatozoides bovinos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 11/11/2014

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Priscila Marques Moura de Leon

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Msc. Caroline Gomes Lucas

Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos colegas de GPO *Embryo* que estiveram sempre ao meu lado e se dedicaram ao máximo para a realização do mesmo.

Agradecimentos

Aos meus pais Ruy e Nara pelo carinho, apoio e dedicação depositados em mim não só durante minha formação acadêmica.

Ao meu irmão gêmeo Marcelo por dividir comigo não só os momentos de conquistas, mas também os de estresse e dificuldades da vida acadêmica.

Aos colegas e amigos, Jéssica, Matheus, Najara e Liliane, por dividir os melhores momentos da graduação e por tornarem estes 5 anos uma experiência a ser lembrada para todo o sempre.

Ao meu orientador e amigo, professor Vinicius Campos por todas as oportunidades dadas, paciência, ensinamentos e pela dedicação em fazer da minha formação um caminho de grande aprendizado.

Aos professores Tiago e Fabiana por terem acreditado no meu potencial e me permitirem fazer parte do Grupo de Pesquisa em Oncologia, no qual pude aproveitar ao máximo a experiência e conhecimento adquiridos durante os 3 anos como iniciação científica.

À doutoranda Eliza por ter me apresentado a área de produção *in vitro* de embriões bovinos, por todo o conhecimento passado e pelos momentos divertidos durante as rotinas no laboratório.

Aos pós-graduandos e companheiros de experimento do TCC, Mariana, Caroline e Tony, os quais se dedicaram ao máximo tanto para fazermos um trabalho de qualidade quanto de tornar o dia a dia mais divertido.

Aos colegas de laboratório Nathaniele, Eduardo, Martin, Julieti, Luiza, Maria Eduarda, Natália, Daniel, Liziane, Eduarda, Helena, Priscila, Mariana e Karine pela amizade, apoio, colaboração e convivência agradável.

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas pelos ensinamentos.

A todos que colaboraram de alguma forma, muito obrigado !

***“We are your friends,
You'll never be alone again”.***
(Gaspard Augé & Xavier de Rosnay)

Resumo

DOMINGUES, William Borges. ICSI-NanoSMGT: Estabelecimento de metodologia de transfecção de DNA exógeno associado a nanoestruturas catiônicas em espermatozoides bovinos. 2014. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar a captação de DNA exógeno na técnica de transferência gênica por espermatozoides (SMGT), porém a frequência da prole transgênica permanece baixa. Duas novas metodologias foram propostas: o uso da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para fornecer espermatozoides transfectados diretamente dentro do oócito, sendo chamada de ICSI-SMGT; e o uso de nanoestruturas para introduzir DNA exógeno nas células espermáticas, fazendo surgir uma nova técnica conhecida como NanoSMGT. O trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de transfecção de DNA exógeno associado a nanoestruturas catiônicas e nanotubos de haloisita em espermatozoides bovinos. Os parâmetros de qualidade espermática, como motilidade, integridade de membrana foram avaliados antes e após a transfecção através de microscopia óptica. Os espermatozoides também foram avaliados quanto à taxa de apoptose através de citometria de fluxo antes e após a transfecção. A transfecção com lipossomas ou dendrímeros catiônicos não alterou o padrão de qualidade dos espermatozoides, uma vez que não foi observada alteração da motilidade ($P > 0,05$), danos à membrana ($P > 0,05$) ou aumento do número de espermatozoides em apoptose ($P > 0,05$). Neste trabalho foram relatados pela primeira vez, até o presente momento, resultados à cerca dos efeitos da transfecção com nanoestruturas catiônicas comerciais em células espermáticas bovinas. Estes resultados demonstram os espermatozoides transfectados poderão ser utilizados para a produção *in vitro* de embriões transgênicos através da técnica de ICSI-NanoSMGT.

Palavras-chave: SMGT; dendrímero; lipossoma; nanoestruturas catiônicas; nanotecnologia.

Abstract

DOMINGUES, William Borges. ICSI-NanoSMGT: Establishment of a methodology for transfection of exogenous DNA associated with cationic nanostructures in bovine sperm. 2014. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014

Several approaches have been used to improve the uptake of exogenous DNA in the technique of sperm mediated gene transfer (SMGT), but the frequency of transgenic progeny remains low. Two new methods have been proposed: the use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to provide sperm transfected directly into the oocyte, being called ICSI-SMGT; and the use of nanostructures for introducing exogenous DNA into sperm cells, making a new technique known as NanoSMGT arise. The study aimed to develop a methodology for transfection of exogenous DNA associated with cationic nanostructures and halloysite clay nanotubes in bovine sperm. Sperm quality parameters such as motility, membrane integrity were evaluated before and after transfection through optic microscopy. The spermatozoa were also evaluated for rate of apoptosis by flow cytometry before and after transfection. The transfection with cationic liposomes or dendrimers did not alter the pattern of sperm quality, since changes in motility ($P > 0,05$), membrane damage ($P > 0,05$) or increasing the number of apoptotic spermatozoa was not observed ($P > 0,05$). This work was first reported, to date, the results about the effects of transfection with commercial cationic nanostructures in bovine sperm cells. These results demonstrate the transfected sperm can be used for in vitro production of transgenic embryos by ICSI-NanoSMGT.

Keywords: SMGT; dendrimer; liposome; cationic nanostructures; nanotechnology.

Lista de figuras

Figura 1	Motilidade espermática antes e após os processos de transfecção	25
Figura 2	Microscopia de fluorescência de espermatozoides transfectados submetidos ao kit LIVE/DEAD® Sperm Viability	26
Figura 3	Integridade espermática antes e após os processos de transfecção	26
Figura 4	Taxa de células espermáticas em apoptose, antes e após os processos de transfecção	27

Lista de Abreviaturas e Siglas

CMV	Citomegalovírus
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
IA	Inseminação Artificial
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
LB	Luria-Bertani
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanometro
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
SCNT	Transferência Nuclear de Célula Somática
SMGT	Transferência Gênica Mediada por Espermatozoide
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Sumário

1	Introdução	13
1.1	Objetivo geral	14
1.2	Objetivos específicos	14
2	Revisão de literatura	15
2.1	Produção de animais transgênicos	15
2.2	Transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT)	16
2.3	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide associada à SMGT (ICSI-SMGT)	17
2.4	Nanotecnologia associada à SMGT (NanoSMGT)	18
3	Metodologia	20
3.1	Desenho experimental	20
3.2	Preparo do DNA exógeno	20
3.2.1	pEGFP-N1	20
3.2.2	Transformação das células bacterianas e condições de cultivo	21
3.2.3	Propagação e extração plasmidial	21
3.2.4	Quantificação do plasmídeo	21
3.3	Origem e preparo do sêmen	22
3.4	Métodos de transfecção	22
3.4.1	Transfecção com DNA exógeno puro	22
3.4.2	Transfecção com lipossoma catiônico	22
3.4.3	Transfecção com dendrímero catiônico	22
3.4.4	Transfecção com nanotubos de haloisita	23
3.5	Avaliação da motilidade espermática	23
3.6	Avaliação da integridade da membrana espermática	23
3.7	Avaliação da taxa de apoptose nos espermatozoides	24
3.8	Análise dos dados	24
4	Resultados	25
4.1	Propagação e extração plasmidial.....	25
4.2	Motilidade espermática	25
4.3	Integridade da membrana espermática	26
4.4	Taxa de apoptose nos espermatozoides	27
5	Discussão	28

6 Considerações finais	30
Referências	31

1 Introdução

A produção de animais transgênicos é uma das ferramentas biotecnológicas que mais cresce no meio científico, visto que exerce um papel essencial na produção animal, através da melhora na qualidade e aumento da produção (SALAMONE et al., 2012) e permite o estudo de diversas doenças humanas, gerando animais transgênicos que podem mimetizar distúrbios de saúde (PETTERS; SOMMER, 2000). Frente à vasta aplicabilidade, diversas técnicas têm sido utilizadas para geração de animais transgênicos, sendo que a transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT) recebe destaque, por ser considerada simples e de baixo custo (CAMPOS et al., 2011a; EGHBALSAIED et al., 2013).

Embora animais transgênicos tenham sido gerados pela SMGT, sua eficiência ainda é comprometida, principalmente devido à baixa taxa de transfecção de DNA exógeno para os espermatozoides (apenas 35%), a qual gera um reduzido número de oócitos fertilizados, (EGHBALSAIED et al., 2013; SIM et al., 2013).

A captação limitada de DNA exógeno pelos espermatozoides e sua degradação posterior por DNases presentes tanto no plasma seminal quanto nas células espermáticas continuam a ser os principais fatores subjacentes à baixa eficiência desta técnica (CAMPOS et al., 2011a; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2009).

Várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar a captação de DNA exógeno (AMARAL et al., 2011; COLLARES et al., 2010; HOELKER et al., 2007), porém a frequência da prole transgênica ainda é baixa. Por outro lado, o uso bem sucedido de nanoestruturas para introduzir DNA exógeno em células eucarióticas (ARRUEBO et al., 2007; ZOHRA et al., 2009) trouxe novas perspectivas para a produção de embriões transgênicos, sendo a técnica chamada de NanoSMGT (CAMPOS et al., 2011b).

No entanto, mesmo com estas novas tecnologias de transfecção, a taxa de transgênese ainda é baixa quando a inseminação artificial (IA) ou a fertilização *in vitro* (FIV) são utilizadas na SMGT. Para superar as limitações na SMGT, outra inovação tem sido o uso da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

para fornecer espermatozoides transfectados diretamente para dentro do oócito, sendo chamada de ICSI-SMGT (PERRY et al., 1999).

Desta forma, buscando otimizar a transfecção em espermatozoides, se fez necessário o desenvolvimento de uma metodologia de SMGT associada ao uso de nanoestruturas catiônicas, para utilização na produção de embriões bovinos transgênicos através de ICSI.

1.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia de transfecção de DNA exógeno associado a nanoestruturas catiônicas capaz de otimizar a técnica de SMGT em espermatozoides bovinos, e que possa ser utilizada para ICSI.

1.2 Objetivos específicos

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

- avaliar os efeitos da transfecção com dendrímero e lipossoma catiônicos comerciais sobre parâmetros de qualidade espermática, como, motilidade, integridade da membrana e taxa de apoptose;

2 Revisão de literatura

2.1 Produção de animais transgênicos

A produção de animais transgênicos tem como objetivo a obtenção de animais geneticamente modificados, através de engenharia genética, fazendo com que os mesmos tenham integrado em seu genoma DNA exógeno, de modo com que a prole também apresente este transgene e o mesmo seja expresso (MIAO, 2013). Atualmente, a produção de animais transgênicos é uma das ferramentas biotecnológicas que mais cresce no meio científico

Em 1980 foi publicado o primeiro trabalho nesta área, no qual Gordon et al. produziram camundongos contendo transgene inserido em seu genoma através da técnica de injeção pronuclear de DNA exógeno (GORDON et al., 1980). Desde então, diversos pesquisadores relataram a geração de animais transgênicos de diferentes espécies, como por exemplo, bovinos (GARCIA-VAZQUEZ et al., 2009), suínos (HAMMER et al., 1985), ovinos (WRIGHT et al., 1991), peixes (KHOO et al., 1992), e outras espécies (revisado por HOUDEBINE, 2009)

Portanto, a transgênese animal está se consolidando como uma ferramenta importante nas áreas de medicina, biologia e biotecnologia, pois ela torna possível o estudo da função celular e molecular de diversos genes (MI et al., 2013); exerce um papel essencial na produção animal, propiciando uma melhora na qualidade e aumento da produção (SALAMONE et al., 2012); e, ainda permite o estudo de diversas doenças humanas, uma vez que os animais transgênicos podem mimetizar distúrbios de saúde e, assim, possibilitar a avaliação de novos fármacos (PETTERS; SOMMER, 2000). Em bovinos, a transgênese tem sido explorada para diversas finalidades, incluindo a produção de proteínas farmacêuticas no leite de vacas (YANG et al., 2011) ou induzindo um aumento da massa muscular em machos (MILAZZOTTO et al., 2010).

Deste modo, frente à vasta aplicabilidade, diversas técnicas têm sido utilizadas para geração de animais transgênicos, como a microinjeção (DEMAYO et al., 2012), transferência nuclear de células somáticas (SCNT) (BORDIGNON et al., 2013), vetores lentivirais (LIU et al., 2013), SMGT (EGHBALSAIED et al., 2013), ICSI

(LI et al., 2011), entre outras. No entanto, estas técnicas apresentam certas limitações. Segundo Miao (2013), as taxas de sucesso e de sobrevivência ainda são muito comprometidas e a eficiência de integração do transgene no genoma é baixa e instável, levando ao silenciamento gênico e dano ao genoma do hospedeiro, com isso, dificultando a produção de animais transgênicos.

2.2 Transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT)

A técnica de SMGT se baseia na capacidade do espermatozoide em introduzir no oócito não só o seu próprio genoma durante a fertilização, mas também o DNA exógeno com a qual ele pode entrar em contato (SPADAFORA, 2012, p. 3).

O conceito foi criado em 1989, quando foi relatado pela primeira vez que o DNA exógeno incubado com sêmen de camundongo podia ser detectado em alguns tecidos da prole (LAVITRANO et al., 1989). Esta constatação inicial promoveu um aumento do uso desta técnica, com o intuito de esclarecer os mecanismos moleculares básicos por trás da SMGT e, também, desenvolver aplicações da biotecnologia para gerar animais transgênicos.

Uma vez que esta técnica é considerada simples e de baixo custo, ela pôde ser aplicada com sucesso na geração de animais transgênicos em diferentes espécies, como por exemplo, em aves domésticas (NAKANISHI; IRITANI, 1993), peixes (KHOO et al., 1992), suínos (WEBSTER et al., 2005), bovinos (HOELKER et al., 2007), e outras.

O uso da SMGT na transgênese pode melhorar o desempenho do animal, e também permitir a produção de proteínas e de produtos farmacêuticos no leite de mamíferos. Além disso, ela pode ser usada para gerar animais modelos de estudo para doenças humanas ou animais, e ainda, a técnica pode ser utilizada com o objetivo de se produzir animais multitransgênicos para serem utilizados em xenotransplantes (HÖLKER et al., 2012).

No entanto, tem sido observada uma variação na eficiência entre as espécies. Enquanto que o uso da SMGT para gerar suínos transgênicos alcança uma eficiência de até 80% (LAVITRANO et al., 2002), em bovinos, essa técnica ainda apresenta uma eficiência muito limitada (média de 20%) devido principalmente às baixas taxas de transfecção, resultantes da degradação do DNA exógeno por DNases presentes tanto no plasma seminal quanto nas células espermáticas

(CAMPOS et al., 2011a; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2009; LANES et al., 2009). Com isso, várias abordagens como a eletroporação (COLLARES et al., 2010), lipofecção (HOELKER et al., 2007), complexos de DNA/DMSO (AMARAL et al., 2011), integração mediada por restrição enzimática (HAREL-MARKOWITZ et al., 2009), entre outras, têm sido utilizadas para melhorar a captação do DNA exógeno pelo espermatozoide.

Apesar destas estratégias de transfecção, a taxa de transgênese ainda é baixa quando a IA ou a FIV (2,4% e 16,6%, respectivamente) são utilizadas na SMGT (SCHELLANDER et al., 1995). Buscando melhores resultados, duas novas metodologias foram propostas: o uso da ICSI para fornecer espermatozoides transfectados diretamente para dentro do oócito, sendo chamada de ICSI-SMGT (PERRY et al., 1999); e o uso de nanoestruturas para introduzir DNA exógeno nas células espermáticas, sendo chamada de NanoSMGT (CAMPOS et al., 2011b).

2.3 Injeção intracitoplasmática de espermatozoide associada à SMGT (ICSI-SMGT)

Uma alternativa à FIV convencional é a técnica de ICSI, que consiste na injeção de um único espermatozoide no interior do citoplasma do oócito com auxílio de micromanipuladores, visando à sua fertilização (MATOS, 2004, p. 1).

A ICSI permite o uso de células espermáticas imóveis, de baixa capacidade fecundante ou disponíveis em número limitado, apresentando grande aplicabilidade na reprodução da espécie bovina para a FIV com sêmen de baixa capacidade fecundante (HAMANO et al., 1999), na maximização do uso de sêmen de alto valor (OIKAWA et al., 2001) e para a produção de animais transgênicos (GARCIA-VAZQUEZ et al., 2009).

Uma grande inovação tem sido o uso da injeção ICSI para fornecer espermatozoides transfectados diretamente dentro do oócito, sendo relatado pela primeira vez em camundongos, sendo chamada de ICSI-SMGT (PERRY et al., 1999) Posteriormente esta técnica foi desenvolvida em suínos (GARCÍA-VÁZQUEZ et al., 2009), caprinos (SHADANLOO et al., 2010), bovinos (BEVACQUA et al., 2010), ovinos (PEREYRA-BONNET et al., 2011) e recentemente em equinos (ZANIBONI et al., 2013).

Para permitir uma entrada eficiente de DNA exógeno na ICSI-SMGT é necessário danificar a membrana plasmática dos espermatozoides por congelamento e descongelamento, ou por um agente tensoativo (PERRY et al., 1999). Estes pré-tratamentos podem provocar a fragmentação do DNA (SZCZYGIEL et al. 2003) ou danificar o núcleo da célula, levando a uma redução na eficiência da embriogênese após a ICSI (GARCÍA-VÁZQUEZ et al., 2009; ODDI et al., 2012).

No entanto, o uso bem sucedido de nanoestruturas para introduzir DNA exógeno em células eucarióticas (ARRUEBO et al., 2007; ZOHRA et al., 2009) trouxe novas perspectivas para a produção de embriões transgênicos através da SMGT.

2.4 Nanotecnologia associada à SMGT (NanoSMGT)

Considerando que uma das maiores limitações da técnica de SMGT continua sendo a etapa de entrada de DNA exógeno nos espermatozoides (CAMPOS et al., 2011a), algumas estratégias já foram adotadas para melhorar as taxas de transfecção (COLLARES et al., 2010; HAREL-MARKOWITZ et al., 2009; HOELKER et al., 2007). Entre essas melhorias, o uso de nanoestruturas, como nanotubos e dendrímeros, trouxe novas possibilidades e perspectivas (CAMPOS et al., 2011b), uma vez que essas nanoestruturas podem proteger o DNA exógeno durante a entrada na célula alvo, atuando como uma barreira física contra a ação de DNases (WU et al., 2008). A combinação da nanotecnologia à SMGT fez surgir uma nova abordagem, chamada de NanoSMGT (CAMPOS et al., 2011c).

Estas nanoestruturas funcionais têm sido utilizadas com sucesso para entregar fármacos e moléculas de ácido nucleico em células e tecidos de animais (VALENTINI et al., 2013). Lipossomas que apresentam lipídios de carga positiva na sua superfície, acabam sendo classificados como lipossomas catiônicos. Os lipídios catiônicos, os quais compõem este tipo específico de nanoestrutura, são moléculas anfifílicas compostas de uma ou duas cadeias de ácido graxo acopladas a um grupo éster e um grupamento aminico hidrofílico (EL-ANEED, 2004). Há duas décadas, desde a sua descoberta, estas nanoestruturas têm sido utilizadas para liberação de ácidos nucleicos dentro de diferentes tipos celulares (DASS; CHOONG, 2006). Os lipossomas catiônicos interagem com o DNA através de interações eletrostáticas, já que a molécula de DNA é carregada negativamente. A carga total do complexo

formado por essa interação mantém-se com valor positivo e com isto, pode ocorrer a ligação eficiente do mesmo com a membrana da célula a ser transfectada, sendo a internalização através de endocitose (BATISTA et al., 2007).

Nanopolímeros sintéticos altamente ramificados, também conhecidos como dendrímeros, representam uma outra classe de nanoestruturas que podem ser utilizadas na transfecção de células (BASARKAR; SINGH, 2007). Os dendrímeros com grupos terminais carregados positivamente são denominados como catiônicos, e devido a essa particularidade podem se ligar ao DNA, formando complexos, análogos aos formados por lipossomas catiônicos, os quais funcionam como uma barreira física contra a ação de enzimas de restrição presentes no interior da célula (RAMASWAMY et al., 2003).

Dentre as nanoestruturas hoje disponíveis, os nanotubos de haloisita (HCNs) também são de particular interesse. São formados por nanomaterial natural, com depósitos em vários países, incluindo os EUA e o Brasil (LEVIS; DEASY, 2002). Os nanotubos de haloisita são biocompatíveis e incorporados quase que espontaneamente pelas células. O diâmetro do seu lúmen interno é compatível com diversas macromoléculas e proteínas, o que permite o encapsulamento e liberação lenta destas moléculas (VERGARO et al., 2010). Estas características tornaram este nanomaterial um agente de transfecção potencialmente funcional para uso na SMGT em bovinos.

Campos et al. (2011b) demonstraram que o uso de nanoestruturas foi capaz de aumentar o número de plasmídeos internalizados por células espermáticas em comparação com outros métodos de transfecção comuns, tais como lipofecção ou de incubação (153, 53 e 50 cópias de plasmídeos/espermatozoide, respectivamente). Além disso, não foram evidenciados efeitos negativos sobre a integridade celular, motilidade espermática e desenvolvimento do embrião, o que confirmou a biocompatibilidade da nanoestrutura utilizada.

3 Metodologia

3.1 Desenho experimental

Baseado nos resultados a cerca dos efeitos de diferentes concentrações das nanoestruturas catiônicas comerciais (K2[®] *Transfection Reagent*, Biontex Laboratories, Alemanha; e PolyFect[®], QIAGEN, EUA) sobre a motilidade e integridade espermática, uma vez que até o presente momento não há relato do uso das mesmas em células espermáticas, foram eleitas as melhores concentrações para os grupos de transfecção com lipossoma catiônico (60µg) e com dendrímero catiônico (120µg).

Os grupos experimentais foram definidos de acordo com o processo de transfecção utilizado: 1) controle sem transfecção; 2) transfecção com DNA exógeno puro; 3) transfecção com DNA exógeno associado a lipossoma catiônico; 4) transfecção com DNA exógeno associado a dendrímero catiônico; e 5) transfecção com DNA exógeno associado a nanotubo de haloisita.

As avaliações de motilidade, integridade de membrana e taxa de apoptose dos espermatozoides foram realizadas imediatamente antes da transfecção (após o descongelamento das células espermáticas) e depois da transfecção (após 1h de incubação dos espermatozoides com o DNA exógeno puro ou associado às nanoestruturas). Todas as avaliações foram executadas ao menos três vezes e as análises estatísticas realizadas considerando-se valores significantes de $P < 0,05$.

3.2 Preparo do DNA exógeno

3.2.1 pEGFP-N1

O DNA exógeno utilizado neste estudo foi o plasmídeo comercial pEGFP-N1 (GenBank #U55762) otimizado para expressão em células de mamíferos, o qual codifica uma isoforma de GFP (*green fluorescent protein*), que produz uma fluorescência mais brilhante e elevada, sendo. O plasmídeo contém ainda um gene de resistência ao antibiótico canamicina e um sítio de múltipla clonagem localizado imediatamente anterior ao promotor de citomegalovírus (CMV) e a sequência codificadora de EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).

3.2.2 Transformação das células bacterianas e condições de cultivo

A cepa *E. coli* TOP10 foi utilizada para a propagação plasmidial, sendo a mesma cultivada a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 1,5% ágar) e, quando necessário, suplementado com 50µg/mL de canamicina para o cultivo.

O processo de transformação para inserção do plasmídeo nas células bacterianas foi realizado através de choque-térmico. Após as transformações, foi adicionado 1mL de meio LB líquido nas amostras e deixado em cultivo sob agitação durante 1h a 37°C. Posteriormente, foram preparadas placas de LB sólido e as células foram cultivadas por 16h a 37°C.

3.2.3 Propagação e extração plasmidial

A partir de colônias contendo o plasmídeo pEGFP-N1, foram feitos inóculos de cultura bacteriana em 300mL de meio LB líquido, contendo o antibiótico canamicina. O DNA plasmidial foi isolado e purificado utilizando o kit comercial Nucleobond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Alemanha), seguindo instruções do fabricante.

Primeiramente, as células bacterianas foram lisadas e o conteúdo intracelular neutralizado. O lisado foi submetido a um filtro com coluna de sílica, visando a separação do material genético dos demais componentes celulares. O conteúdo retido na coluna foi lavado e eluído em 15mL de tampão de eluição, sendo a seguir submetido a uma etapa de precipitação com isopropanol para separação do DNA cromossomal e plasmidial. A fase aquosa contendo DNA plasmidial foi separada em tubos de microcentrifuga, lavada e centrifugada para obtenção de um *pellet*, o qual foi eluído em 200µL de água estéril livre de DNase e RNase.

3.2.4 Quantificação do plasmídeo

O DNA plasmidial obtido foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento Nanovue™ (GE Healthcare Life Science, EUA), utilizando absorbância no comprimento de onda de 260nm, e a pureza avaliada pela razão entre as absorbâncias obtidas em 260nm e 280nm, sendo considerados puros os plasmídeos que apresentam valores entre 1,7 e 1,9.

3.3 Origem e preparo do sêmen

O sêmen bovino foi adquirido comercialmente de três machos da raça Angus (CRV Lagoa Ltda., São Paulo). De acordo com o fornecedor, cada dose consiste de 15×10^6 espermatozoides. As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30seg e centrifugadas duas vezes para confecção de um *pool* para cada grupo experimental. A concentração foi ajustada para 1×10^6 espermatozoides/200 μl de meio Opti-MEM (Invitrogen[®], EUA).

3.4 Métodos de transfecção

3.4.1 Transfecção com DNA exógeno puro

Uma solução contendo 10 μg de plasmídeo diluído em 200 μL de meio Opti-MEM foi incubada com 1×10^6 durante 1h à $36,5^\circ\text{C}$.

3.4.2 Transfecção com lipossoma catiônico

Duas soluções foram preparadas: Solução A: 10 μg de plasmídeo; e Solução B: 60 μg de reagente de transfecção K2[®]. As Soluções A e B foram misturadas e incubadas em tubos de microcentrifuga durante 20min à temperatura ambiente, permitindo a formação de complexos lipossoma-DNA exógeno.

Após a incubação, a solução contendo os complexos foi adicionada ao pool de espermatozoides (1×10^6 células) em um volume total de 200 μL , seguido por um período de incubação de 1h à $36,5^\circ\text{C}$.

3.4.3 Transfecção com dendrímero catiônico

Duas soluções foram preparadas: Solução A: 10 μg de DNA exógeno; e Solução B: 120 μg de reagente de transfecção PolyFect[®]. Seguindo as instruções do fabricante, as soluções A e B foram misturadas e incubadas em tubos de microcentrifuga durante 10min à temperatura ambiente, permitindo a formação de complexos dendrímero-DNA exógeno.

Logo após, a solução contendo os complexos foi adicionada ao pool de espermatozoides (1×10^6 células) em um volume total de 200 μL , seguido por um período de incubação de 1h a $36,5^\circ\text{C}$.

3.4.4 Transfecção com nanotubos de haloisita

Os nanotubos de haloisita são naturalmente obtidos em depósitos de argila de diversos países, inclusive no Brasil, entretanto, para uma padronização experimental foram obtidos nanotubos comercialmente disponíveis (Sigma-Aldrich, Cat. #685445). Os nanotubos foram diluídos em meio Opti-MEM em uma concentração de 75µg/mL, como descrito por Vergaro et al. (2010).

Duas soluções foram preparadas: Solução A: 10µg de plasmídeo; e solução B: 50µl de nanotubos já diluídos na concentração de 75µg/mL de meio OptiMEM. As Soluções A e B foram misturadas e incubadas em tubos de microcentrifugas durante 1h à temperatura ambiente. Após a incubação, a solução contendo os complexos nanotubos-DNA exógeno foi adicionada ao *pool* de espermatozoides (1×10^6 células) em um volume total de 200µL, seguido por um período de incubação de 1h à 36,5°C.

3.5 Avaliação da motilidade espermática

A motilidade espermática foi avaliada visualmente em quatro campos com aproximadamente 100 espermatozoides em cada, sob microscopia de contraste de fase, sendo a percentagem média de espermatozoides com vigor e movimento linear contabilizada de forma independente por três avaliadores.

3.6 Avaliação da integridade da membrana espermática

A integridade da membrana das células espermáticas transfectadas foi avaliada utilizando o kit LIVE/DEAD[®] Sperm Viability (Invitrogen[®], USA) seguindo as instruções do fabricante. O número de células coradas em verde (íntegras) e em vermelha (lesadas) em um total de 100 espermatozoides foi contabilizado de forma independente por três avaliadores, sob um microscópio de fluorescência, sendo esta variável expressa como a percentagem média de espermatozoides viáveis.

3.7 Avaliação da taxa de apoptose nos espermatozoides

O kit Guava TUNEL (Guava Technologies Inc, EUA) foi utilizado na citometria de fluxo (Guava EasyCyte, Millipore[®], EUA) para avaliação da taxa de apoptose nos espermatozoides transfectados, seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, cerca de 1×10^4 de espermatozoides foram lavados em meio PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e fixados em etanol 70% por 24h. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma solução de marcação de DNA fragmentado e analisadas por citometria de fluxo, sendo gerado um gráfico que permitiu distinguir em percentagens duas diferentes populações de espermatozoides em cada grupo experimental: células apoptóticas (TUNEL positivas) e não apoptóticas (TUNEL negativas).

3.8 Análise de dados

A motilidade, integridade de membrana e a taxa de apoptose das células espermáticas, antes e após os processos de transfecção, foram comparadas usando teste t. A taxa de internalização de DNA exógeno pelos espermatozoides foi comparada através de ANOVA.

4 Resultados

4.1 Propagação e extração plasmidial

Foram obtidas três alíquotas com concentração média de $1.108\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de pEGFP-N1. A pureza do plasmídeo extraído foi também avaliada por espectrofotometria, considerando a razão entre as absorvâncias obtidas em 260nm e 280nm. As alíquotas obtidas apresentaram esta razão de qualidade dentro do intervalo aceitável de 1,7 à 1,9.

4.2 Motilidade espermática

Através da visualização em microscópio óptico foi possível analisar a motilidade espermática, antes e depois da transfecção, em todos os grupos. Não foi observada diminuição da motilidade após a transfecção nos grupos experimentais, incluindo o controle sem transfecção ($P>0,05$) (Figura 1).

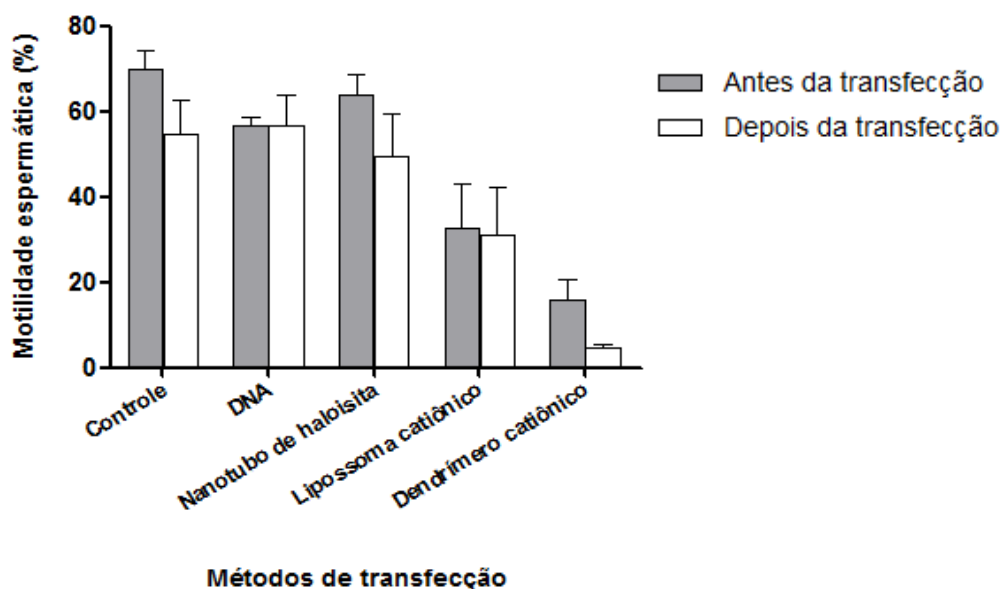


Figura 1 – Motilidade espermática antes e após o processo de transfecção. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

4.3 Integridade da membrana espermática

Quanto à integridade da membrana espermática, analisada por microscopia de fluorescência, foi possível observar e contabilizar o número de células espermáticas com membrana íntegra (verdes) e as com dano de membrana (vermelhas) (Figura 2).

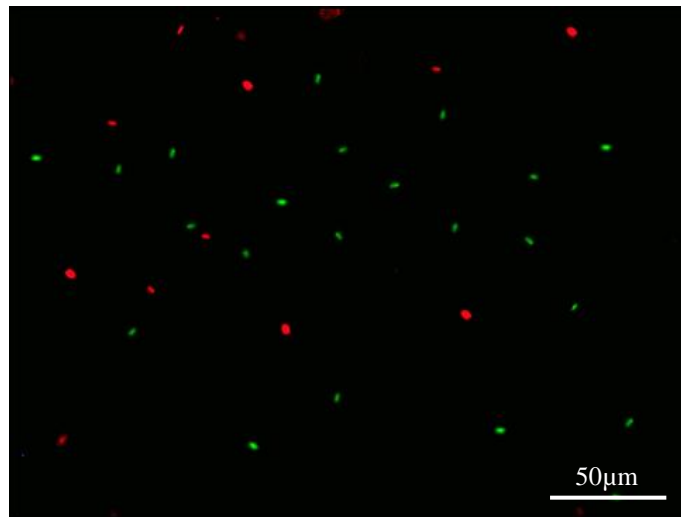


Figura 2 – Imagem de microscopia de fluorescência de espermatozoides transfectados submetidos ao kit LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit. Ampliação de 400x. As células íntegras estão coradas em verde e as células com dano de membrana em vermelho.

A internalização do DNA exógeno puro ou associado aos diferentes transfectantes utilizados não influenciou de forma negativa a integridade da membrana dos espermatozoides ($P > 0,05$) (Figura 3).

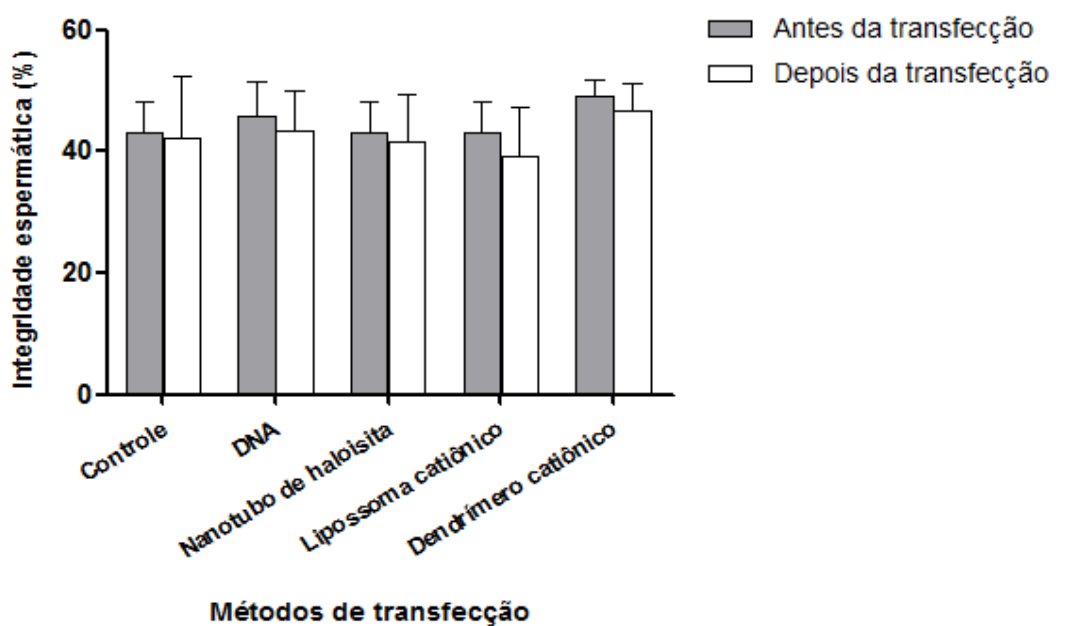


Figura 3 – Integridade espermática antes e após os processos de transfecção. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

4.4 Taxa de apoptose nos espermatozoides

Através da análise por citometria de fluxo, foi possível obter a taxa de células espermáticas em apoptose submetidas aos diferentes processos de transfecção (Figura 4). Após 1 hora de transfecção, não foi observada aumento do número de células apoptóticas ($P>0,05$) nos grupos.

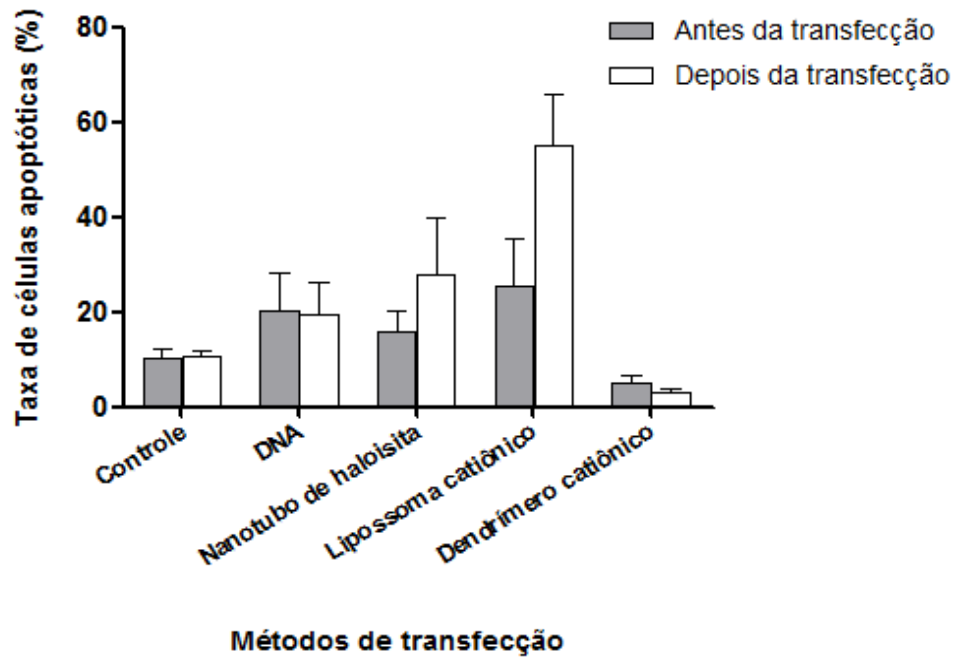


Figura 4 – Taxa de células espermáticas em apoptose, antes e após os processos de transfecção. Os dados estão representados em média e desvio padrão.

5 Discussão

No presente trabalho não foi observada diminuição da motilidade espermática. Acredita-se que o uso destes transfectantes catiônicos acaba por proteger o DNA exógeno contra a ação das enzimas de restrição intracelulares, uma vez que, Anzar e Buhr (2006, p. 668) acreditam que a diminuição da motilidade nos espermatozoides transfectados, resultado observado na maioria das publicações, está diretamente relacionada à ativação de DNases no interior das células, que causam a clivagem do DNA exógeno e que culmina na morte celular por apoptose. No entanto, os resultados em relação à motilidade variam entre os autores, e por isso, Canovas et al. (2010) afirmam que embora mais de 100 artigos sobre a SMGT tenham sido publicados nos últimos 20 anos, o efeito do transfecção de DNA exógeno sobre a fisiologia dos espermatozoides ainda não é totalmente claro. Deste modo, acreditamos que uma análise do perfil de expressão de genes relacionados à morte das células espermáticas se faz necessário, buscando contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares da NanoSMGT.

No que se refere à integridade da membrana dos espermatozoides, as nanoestruturas utilizadas no trabalho se mostraram biocompatíveis, uma vez que a internalização das mesmas não causou danos à membrana celular. Campos et al. (2011c) já haviam demonstrado a eficiência e compatibilidade dos nanotubos de haloisita com células espermáticas, no entanto, até o momento, este é o primeiro relato do uso dos transfectantes comerciais baseados em dendrímero e lipossoma catiônicos (PolyFect[®] e K2[®] respectivamente) na SMGT em bovinos. Segundo Marvaniya et al. (2010), o processo de internalização de dendrímeros catiônicos se dá primeiramente por atração eletrostática seguida por endocitose, sem que ocorra a ruptura ou dano acentuado à membrana das células transfectadas. A internalização dos lipossomas catiônicos por células se dá de maneira semelhante, sem a evidência de danos à membrana que possam comprometer a viabilidade celular (Ma et al., 2007).

Neste estudo, foram observadas baixas taxas de células espermáticas transfectadas em apoptose, resultado que nos faz acreditar que estas nanoestruturas acabam por proteger o DNA exógeno durante a entrada nos espermatozoides e

acabam por inibir a ativação de DNases intracelulares e conseqüentemente a clivagem tanto do DNA exógeno quanto do DNA genômico, o que induziria a morte destas células por apoptose (Anzar; Buhr, 2006). Feitosa et al. (2010) também obtiveram resultados semelhantes quando os efeitos da transfecção de DNA exógeno puro sobre a taxa de apoptose das células espermáticas foram verificados através da técnica de TUNEL em citometria de fluxo. No entanto, demonstramos que mesmo utilizando uma quantidade 20 vezes maior de DNA exógeno do que os mesmos, não foi observado aumento da taxa de apoptose nos espermatozoides transfectados com as nanoestruturas. Estes dados confirmam que o DNA exógeno não influencia na fragmentação do DNA genômico espermático.

O uso de dendrímeros e lipossomas catiônicos na transfecção de espermatozoides bovinos se mostrou um método eficiente, uma vez que não foi observada diminuição da motilidade, danos à membrana ou aumento da taxa de apoptose. Com isso, acreditamos que as células espermáticas transfectadas poderão ser utilizadas na geração de embriões transgênicos através da técnica de ICSI. Embora não tenha sido observado um decréscimo no padrão da qualidade espermática, este fato não inviabilizaria o uso destas células transfectadas, pois esta técnica permite o uso de espermatozoides com baixa motilidade, imóveis ou de baixa capacidade fecundante (MATOS, 2004).

6 Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que é possível transfectar DNA exógeno associado a dendrímero ou lipossoma catiônico em espermatozoides bovinos, sem que ocorra a diminuição da qualidade das células. Ainda, os espermatozoides transfectados com estas nanoestruturas podem ser utilizados na técnica de ICSI-NanoSMGT, com objetivo de produzir embriões bovinos transgênicos *in vitro*.

Referências

- AMARAL, M. G.; CAMPOS, V. F.; SEIXAS, F. K.; CAVALCANTI, P. V.; SELAU, L.; DESCHAMPS, J. C.; COLLARES, T. 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.
- ANZAR, M.; BUHR, M. M. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 65, n. 4, p. 683-690, 2006.
- ARRUEBO, M.; FERNANDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARIA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 22-32, 2007.
- BASARKAR, A.; SINGH, J. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 353-360, 2007.
- BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BEVACQUA, R. J.; PEREYRA-BONNET, F.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; SALAMONE, D. F. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 922-931, 2010.
- BORDIGNON, V.; EL-BEIROUTHI, N.; GASPERIN, B. G.; ALBORNOZ, M. S.; MARTINEZ-DIAZ, M. A.; SCHNEIDER, C.; LAURIN, D.; ZADWORNÝ, D.; AGELLON, L. B. Production of cloned pigs with targeted attenuation of gene expression. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. 1-7, 2013.
- CAMPOS, V. F.; AMARAL, M. G.; SEIXAS, F. K.; POUHEY, J. L.; SELAU, L. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; DESCHAMPS, J. C.; COLLARES, T. Exogenous DNA uptake by South American catfish (*Rhamdia quelen*) spermatozoa after seminal plasma removal. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 1, p. 136-141, 2011a.
- CAMPOS, V. F.; DE LEON, P. M.; KOMNINOY, E. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; DESCHAMPS, J. C.; SEIXAS, F. K. NanoSMGT: transgene transmission into bovine embryos using halloysite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1552-1560, 2011b.
- CAMPOS, V. F.; KOMNINOY, E. R.; URTIAGA, G.; DE LEON, P. M.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1476-1481, 2011c.
- CANOVAS, S.; GUTIERREZ-ADAN, A.; GADEA, J. Effect of exogenous dna on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. **Molecular Reproduction & Development**, v. 77, p. 687-698, 2010.

- COLLARES, T.; CAMPOS, V. F.; SEIXAS, F. K.; CAVALCANTI, P. V.; DELLAGOSTIN, O. A.; MOREIRA, H. L.; DESCHAMPS, J. C. Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 39-47, 2010.
- DASS, C. R.; CHOONG, P. F. M. Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy. **Peptides**, v. 27, p. 3020-3028, 2006.
- DEMAYO, J L.; WANG, J.; LIANG, D.; ZHANG, R.; DEMAYO, F. J. Genetically engineered mice by pronuclear DNA microinjection. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 1, n. 2, p. 245-262, 2012.
- EGHBALSAIED, S.; GHAEDI, K.; LAIBLE, G.; HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; OBACK, F.; NASR-ESFAHANI, M. H.; OBACK, B. Exposure to DNA is insufficient for in vitro transgenesis of live bovine sperm and embryos. **Reproduction**, v. 145, n. 1, p. 97-108, 2013.
- EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 1-14, 2004.
- FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MILAZZOTTO, M. P.; ROCHA, A. M.; MARTINS, L. F.; SIMÕES, R.; PAULA-LOPES, F. F.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Exogenous DNA uptake by bovine spermatozoa does not induce DNA fragmentation. **Theriogenology**, v. 74, p. 563-568, 2010.
- GARCIA-VAZQUEZ, F. A.; GARCIA-ROSELLO, E.; GUTIERREZ-ADAN, A.; GADEA, J. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 4, p. 506-518, 2009.
- 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**, v. 77, n. 12, p. 7380-7384, 1980.
- HAMANO, K.; LI, X.; QIAN, X.; FUNAUCHI, K.; FURUDATE, M.; MINATO, Y. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1194-1197, 1999.
- HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E.; WALL, 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, n. 6021, p. 20-26, 1985.
- HAREL-MARKOWITZ, E.; GUREVICH, M.; SHORE, L. S.; KATZ, A.; STRAM, Y.; SHEMESH, M. Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 1046-1052, 2009.

HOELKER, M.; MEKCHAY, S.; SCHNEIDER, H.; BRACKET, B. G.; TESFAYE D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; GILLES, M.; RINGS, F.; GRIESE, J.; SCHELLANDER, K. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: effect of transfection reagent and DNA architecture. **Theriogenology**, v. 67, n. 6, p. 1097-1107, 2007.

HÖLKER, M.; GHANEM, N; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K. Sperm-Mediated Gene Transfer: Implications for Biotechnology and Medicine. In: Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies. **Bentham Science Publishers**, 2012. p. 33-42.

HOUDEBINE, Louis-Marie. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 107-121, 2009.

KHOO, H. W.; ANG, L. H.; LIM, H. B.; WONG, K. Y. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. **Aquaculture**, v. 107, n. 1, p. 1-19, 1992.

KIM, T. S.; LEE, S. H.; GANG, G. T.; LEE, Y. S.; KIM, S. U.; KOO, D. B.; SHIN, M. Y.; PARK, C. K.; LEE, D. S. Exogenous DNA uptake of boar spermatozoa by a magnetic nanoparticle vector system. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 201-206, 2010.

LANES, C. F.; SAMPAIO, L. A.; MARINS, L. F. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 525-533, 2009.

LAVITRANO, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; LAZZERESCHI, D.; DI STEFANO, C. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14230-14235, 2002.

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.

LEVIS, S. R.; DEASY, P. B. Characterization of halloysite for use as a microtubular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, n. 1, p. 125-134, 2002.

LI, C.; MIZUTANI, E.; ONO, T.; TERASHITA, Y.; JIA, X. F.; SHI, H. J.; WAKAYAMA, T. Intracytoplasmic sperm injection with mouse spermatozoa preserved without freezing for six months can lead to full-term development. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1183-1190, 2011.

LIU, C.; WANG, L.; LI, W.; ZHANG, X.; TIAN, Y.; ZHANG, N.; HE, S.; CHEN, T.; HUANG, J.; LIU, M. Highly efficient generation of transgenic sheep by lentivirus accompanying the alteration of methylation status. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 23-34, 2013.

MA, B.; ZHANG, S.; JIANG, H.; ZHAO, B.; HONGTAO, L. V. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p. 184-194, 2007.

MARVANIYA, H. M.; PARIKH, P. K.; PATEL, V. R.; MODI, K. N.; SEN, D. J. Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, p. 97-108, 2010.

MATOS, Luis Fonseca. **Produção in vitro de embriões bovinos por meio da Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)**. 2004. 118f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

MI, D.; HUANG, Y.; KLEINJAN, D. A.; MASON, J. O.; PRICE, D. J. Identification of genomic regions regulating Pax6 expression in embryonic forebrain using YAC reporter transgenic mouse lines. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 25-33, 2013.

MIAO, Xiangyang. Recent advances in the development of new transgenic animal technology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 5, p. 815-828, 2013.

MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; FEITOSA, W. B.; MARTINS, L. F.; STRAUSS, B. E.; BAJGELMAN, M. C.; ASSUMPCAO, M. E.; VISINTIN, J. A. Myostatin gene knockdown through lentiviral-mediated delivery of shRNA for in vitro production of transgenic bovine embryos. **Zygote**, v. 18, n. 4, p. 339-344, 2010.

NAKANISHI, A.; IRITANI, A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, n. 2, p. 258-260, 1993.

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.

OIKAWA, T.; HORIUCHI, T.; KIKUCHI, T.; TAKADA, N.; EMUTA, C.; NUMABE, T. Bovine embryo production by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and repeated ovum pick-up (OPU) techniques. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 507-512, 2001.

PEREYRA-BONNET, F.; GIBBONS, A.; CUETO, M.; SIPOWICZ, P.; FERNANDEZ-MARTIN, R.; SALAMONE, D. Efficiency of Sperm-Mediated Gene Transfer in the ovine by laparoscopic insemination, In Vitro Fertilization and ICSI. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 188-196, 2011.

PERRY, A. C.; WAKAYAMA, T.; KISHIKAWA, H.; KASAI, T.; OKABE, M.; TOYODA, Y. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1180-1183, 1999.

PETTERS, R. M.; SOMMER, J. R. Transgenic animals as models for human disease. **Transgenic Research**, v. 9, n. 4, p. 347-351, 2000.

RAMASWAMY, C.; SAKTHIVEL, T.; WILDERSPIN, A. F.; FLORENCE, A. T. Dendriplexes and their characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 17-21, 2003.

SALAMONE, D.; BEVACQUA, R.; HIRIART, M. I.; BUEMO, C.; LUCHETTI, C.; MORO, L.; FERNANDEZ-MARTIN, R. Transgenesis in farm animals. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 772-776, 2012.

SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. **Animal Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 41-50, 1995.

SHADANLOO, F.; NAJAFI, M. H.; HOSSEINI, S. M.; HAJIAN, M.; FOROUZANFAR, M.; GHAEDI, K.; ABEDI, P.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, L.; ESKANDARI-NASAB, M. P.; ESFAHANI, M. H. Sperm status and DNA dose play key roles in sperm/ICSI-mediated gene transfer in caprine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 10, p. 868-875, 2010.

SIM, B. W.; CHA, J. J.; SONG, B. S.; KIM, J. S.; YOON, S. B.; CHOI, S. A.; JEONG, K. J.; KIM, Y. H.; HUH, J. W.; LEE, S. R.; KIM, S. H.; LEE, C. S.; KIM, S. U.; CHANG, K. T. Efficient production of transgenic mice by intracytoplasmic injection of streptolysin-O-treated spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 3, p. 233-240, 2013.

SPADAFORA, Corrado. Sperm-Mediated Gene Transfer: History and Background. In: Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies. **Bentham Science Publishers**, 2012. p. 3-11.

SZCZYGIEL, M. A.; MOISYADI, S.; WARD, W. S. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1903-1910, 2003.

VALENTIN, F.; CARBONE, M.; PALLESCHI, G. Carbon nanostructured materials for applications in nano-medicine, cultural heritage, and electrochemical biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2, p. 451-465, 2013.

VERGARO, V.; ABDULLAYEV, E.; LVOV, Y. M.; ZEITOUN, A.; CINGOLANI, R.; RINALDI, R. Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 3, p. 820-826, 2010.

YANG, B.; WANG, J.; TANG, B.; LIU, Y.; GUO, C.; YANG, P.; YU, T.; LI, R.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LI, N. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. 233-240, 2011.

WEBSTER, N. L.; FORNI, M.; BACCI, M. L.; GIOVANNONI, R.; RAZZINI, R.; FANTINATI, P.; ZANNONI, A.; FUSETTI, L.; DALPRÀ, L.; BIANCO, M. R.; PAPA, M.; SEREN, E.; SANDRIN, M. S.; KENZIE, I. F.; LAVITRANO, M. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 1, p. 68-76, 2005.

WRIGHT, G.; CARVER, A.; COTTOM, D.; REEVES, D.; SCOTT, A.; SIMONS, P.; WILMUT, I.; GARNER, I.; COLMAN, A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. **Biotechnology**, v. 9, n. 9, p. 830-840, 1991.

WU, Y.; PHILLIPS, J. A.; LIU, H.; YANG, R.; TAN, W. Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. **ACS Nano**, v. 2, p. 2023-2028, 2008.

ZANIBONI, A.; MERLO, B.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; LAVITRANO, M.; FORNI, M.; MARI, G.; BACCI, M. L. Expression of fluorescent reporter protein in equine embryos produced through intracytoplasmic sperm injection mediated gene transfer (ICSI-MGT). **Animal Reproduction Science**, v. 137, v. 2, n. 10, p. 53-61, 2013.

ZOHRA, F. T.; CHOWDHURY, E. H.; AKAIKE, T. High performance mRNA transfection through carbonate apatite-cationic liposome conjugates. **Biomaterials**, v. 30, n. 23, p. 4006-4013, 2009.