



AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE ESPERMATOZÓIDE DE JUNDIÁ E DNA EXÓGENO PARA SMGT.

Autor(es): AGUIAR, Ingrid Manoela; BERNEIRA, Elias; COLLARES, Thaís Farias; CAMPOS, Vinícius Farias; LEON, Priscila; AMARAL, Marta Gonçalves; DESCHAMPS, João Carlos; COLLARES, Tiago.

Apresentador: Ingrid Manoela Amaral Cardoso de Aguiar

Orientador: Tiago Collares

Revisor 1: Luciano da Silva Pinto

Revisor 2: Sibeles Borsuk

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Resumo:

A busca de estratégias para gerar peixes transgênicos em massa apresenta dificuldades específicas inerentes a manipulação espermática de cada espécie. Estudos de transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT) tornam-se de significativa importância. Este estudo teve objetivo de determinar a concentração ideal de DNA exógeno para SMGT em jundiá e, delinear seu protocolo. Utilizamos 12 machos, mantidos na Estação de Aquicultura da UFPel, esses foram induzidos artificialmente com HCG de 12-14h antes de cada coleta semanal. Usou-se apenas as amostras que tinham motilidade após a ativação. O EGFP foi o DNA exógeno usado para identificar os espermatozoides transfectados. As amostras foram centrifugadas a 4000 RPM por 10'. Após a separação do plasma seminal, as células foram lavadas com solução isosmótica, foi testada a ativação de cada amostra. Apenas as positivas continuaram no experimento. Este procedimento foi repetido 4x. Os semens selecionados apresentaram grau de ativação 3 ou acima, baseado por escala que varia de 0 a 5. Apenas uma amostra preservou a motilidade até a 4ª lavagem. Para calcular a concentração dos espermatozoides retiramos uma alíquota de cada sêmen, fixada em 4% de formalina numa proporção de 1:5000, a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Valores normais 24.650.000 a 138.950.000 células/mm³. Contagem: 131.065.000 células/mm³. Para verificar a toxicidade os espermatozoides foram diluídos em 3 concentrações de EGFP (50-100-250 ng/μL). As células foram incubadas com EGFP por 50' a 20°C e após lavados 2x com solução isosmótica. Por fim, para avaliar a captação de DNA exógeno pelo espermatozoide, utilizou-se EGFP nas seguintes concentrações: 5-10-20-30-40-50-100ng/106espermatozoides e a motilidade avaliada após 50' de incubação a TA. As amostras foram tratadas com DNase para eliminar o DNA exógeno que não foi transfectado, para confirmar sua presença foi feita a extração de DNA genômico, reações de PCR analisado em gel de agarose 1% com Gelred e visualizado em luz UV. As células incorporaram EGFP nas concentrações de 5 a 100ng/106espermatozoides. Como as células apresentaram motilidade até a concentração de 50ng/μl, sugerimos que a concentração de DNA não ultrapasse 50ng/μl. A determinação da concentração de DNA exógeno irá contribuir para o protocolo de SMGT na geração de jundiás transgênicos, mas serão necessários estudos complementares do plasma seminal, uma vez que ele poderá interferir na interação do DNA exógeno com o espermatozoide na SMGT.