

OBTENÇÃO DE GAMETAS GENETICAMENTE MODIFICADOS DE TILÁPIA DO NILO VIA TRANSDUÇÃO LENTIVIRAL

Fernanda M. P. Tonelli^{1*}, Flávia C. P. Tonelli², Samyra M. S. N. Lacerda³, Rodrigo R. Resende⁴

1. Pesquisadora Instituto Nanocell/Residente pós-doutoral Biologia Celular ICB-UFMG

2. Mestranda UFSJ – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

3. Pesquisadora do ICB-UFMG – Dpto Morfologia

4. Pesquisador Instituto Nanocell/Professor Dpto Bioquímica ICB-UFMG/Orientador

Resumo:

Antes de se obter um animal transgênico não mosaico é necessária a obtenção de, pelo menos, gameta do macho ou da fêmea geneticamente modificado.

Em peixes, a maneira mais utilizada para tanto é a microinjeção do transgene em ovos recém fertilizados, crescimento dos animais até a fase reprodutiva, e cruzamento destes com o selvagem. Na prole, fruto de fertilização envolvendo um gameta modificado de um dos parentais, estará o transgênico total.

Entretanto, devido a dificuldades associadas a esta metodologia, novas estratégias estão sendo desenvolvidas com este fim.

Neste trabalho avaliou-se o potencial de partículas lentivirais para geração de espermatozoides modificados: via modificação genética de células tronco espermatogoniais (SSCs) de tilápia do Nilo ou transdução *in vivo*. Ambas as metodologias foram bem sucedidas; no entanto, o protocolo envolvendo SSCs, apesar de demandar mais tempo, se mostrou como melhor estratégia de obtenção de gametas modificados de maneira sustentada.

Autorização legal: CEUA-UFMG protocolo 89/2012.

Palavras-chave: Tilápia do Nilo geneticamente modificada, transdução lentiviral, espermatogônias tronco.

Apoio financeiro: CNPq / FAPEMIG.

Introdução:

A transgenia de peixes é realizada desde o início dos anos 80, utilizando como técnica padrão a microinjeção de ovos recém fertilizados¹. Comumente, obtém-se primeiramente um animal mosaico, visto que as primeiras clivagens são rápidas (em tilápias - *Oreochromis niloticus* - a primeira ocorre em no máximo 2,5 h. após a fertilização, mantendo-se o ovo à 21°C)². O animal mosaico expressa o gene de interesse em

algumas células de seu organismo, mas não em todas.

Para obtenção do transgênico total, os mosaicos devem ser cruzados com, por exemplo, organismos controle; na prole, aqueles organismos oriundos de um gameta geneticamente modificado serão heterozigotos para o gene de interesse, se apresentando como transgênicos totais.

No entanto, a microinjeção é uma técnica que possui relatos de baixa taxa de eficiência além de requerer pessoas altamente treinadas para injetar corretamente a sequência de interesse utilizando microagulhas de vidro e um micromanipulador³⁻⁵.

Logo, novas metodologias de transgenia vem sendo propostas para obtenção de um melhor resultado, e neste sentido destaca-se a capacidade das partículas lentivirais; estas são capazes de promover a desejada integração genômica do transgene de maneira eficiente em células que estão ou não se dividindo⁶.

Assim, no presente estudo, visou-se desenvolver um protocolo alternativo mais ágil e fácil para geração de espermatozoide geneticamente modificado de tilápias do Nilo utilizando estas partículas lentivirais em duas diferentes estratégias. 1-para transduzir SSCs (e estas gerarem espermatozoide modificado após serem transplantadas para larva receptora e esta atingir a maturidade sexual); 2-para transduzir diretamente os gametas *in vivo*.

Metodologia:

As SSCs foram obtidas através de cultura primária a partir de testículo de animal adulto em meio DMEM/F12 suplementado após dissociação enzimática testicular, centrifugação por gradiente de densidade e plaqueamento diferencial⁷. Estas células foram expostas a partículas lentivirais 6,0x10⁵ TU/mL (contendo no genoma a sequência codificadora da proteína fluorescente vermelha DsRed2) durante 24h. em condições de cultura ótimas pré-estabelecidas. Em seguida, a

expressão da proteína DsRed2 foi analisada por microscopia de fluorescência e quantificada por citometria de fluxo. As SSCs modificadas geneticamente foram selecionadas por Blastidina (6 µg/mL) e transplantadas em larvas de tilápia do Nilo (4 dias após a eclosão do ovo). A produção da proteína fluorescente foi determinada por microscopia de fluorescência e confocal, em análises sucessivas a fim de se verificar se a colonização da gônada seria possível pelas SSCs geneticamente modificadas. Após a maturidade sexual ser atingida, amostras de esperma de receptores do sexo masculino foram analisadas por citometria de fluxo. Os animais cuja amostra foi retirada foram mantidos em tanques a 30°C, e novas amostras foram analisadas 1 semana depois (novo ciclo de espermatogênese completo).

Para transdução *in vivo* tilápias adultas foram anestesiadas e injetadas na papila urogenital através do poro urogenital. A injeção de solução contendo partículas lentivirais, no mesmo teor em que foram utilizadas no protocolo de SSC (6,5x10⁵ TU), se deu via micropipeta de vidro sob estereomicroscópio. Os animais foram mantidos por 1 semana em água de tanque a 30°C para estimular a espermatogênese. As gônadas foram removidas em duplicata 24 h., 3,5 dias e 7 dias após a injeção, e imersas em Tissue-Tek®O.C.T. As seções de criomicrotomia foram coradas, utilizando-se DAPI, e depois analisadas por microscopia de fluorescência. Um e sete dias após a injeção lentiviral os espermatozóides foram também recolhidos por massagem abdominal e submetidos a citometria de fluxo; realizou-se ainda análise imuno-histoquímica dos testículos neste 7º dia.

O mRNA obtido a partir de testículos e esperma isolados foi ainda analisado, para ambas as estratégias, através de RT-PCR.

Resultados e Discussão:

Através da estratégia de modificação genética das SSCs foi possível transduzi-las com as partículas lentivirais utilizadas e a fluorescência de DsRed2 pode ser detectada a partir de 24 h. após a adição das mesmas. Aproximadamente 10% das células exibiam fluorescência antes da seleção por antibiótico. Um mês após a seleção o nível de fluorescência em cultura aumentou para aproximadamente 97% das células.

Sete dias após o transplante já era possível observar-se a fluorescência devida às SSCs transduzidas e transplantadas próximo à área do do poro genital do animal receptor. Um mês após o transplante as SSCs transduzidas

e transplantadas colonizaram a gônada, e a área fluorescente aumentou em dimensão e intensidade. Oitenta por cento dos machos transplantados, após atingir a maturidade sexual, produziram esperma geneticamente modificado em porcentagens variáveis (~ 5% a ~ 77%); possuíam ainda o transcrito DsRed2 em suas gônadas e / ou gametas.

Através da transdução *in vivo* foi possível modificar-se geneticamente células no interior dos testículos do animal. A fluorescência de DsRed2 aumentou com o avançar do tempo de análise. Foram observadas células positivas para DsRed2 no lúmen dos túbulos seminíferos, o que indica a presença de espermatozóides modificados. O mRNA de DsRed2 também foi detectado no testículo e esperma dos animais a partir de 24 h. pós injeção. Após 7 dias, o esperma dos animais infectados, ao ser analisado através de citometria de fluxo, exibiu a fluorescência esperada. Setenta por cento dos animais apresentaram a modificação genética no gameta e o máximo de fluorescência alcançado foi de aproximadamente 52%. Embora em um pequeno número, a análise imuno-histoquímica permitiu a identificação de células germinativas precoces (espermatogônias) e avançadas (espermátides) que expressaram o transgene 7 dias após a injeção lentiviral. No entanto, diferentemente dos espermatozóides modificados oriundos da estratégia envolvendo SSCs, que mantiveram elevado índice de fluorescência na análise 7 dias após a primeira citometria, os gametas dos animais modificados *in vivo* exibiram drástica redução de fluorescência (de ~52% para ~9%) apontando para uma produção não sustentada de gameta modificado geneticamente.

Conclusões:

Utilizando-se a estratégia de transdução *in vivo*, 70% dos animais apresentaram modificação genética no gameta e o máximo de fluorescência alcançado foi de aproximadamente 52%: valores inferiores aos obtidos através do transplante de SSC (80% e ~ 77%, respectivamente). A estratégia de modificar geneticamente as SSCs, além de oferecer a maior taxa de sucesso na obtenção de gametas modificados geneticamente, oferece-a de maneira sustentada (favorecendo a geração, por exemplo, de animais transgênicos através do uso destes gametas na fertilização *in vitro*).

Ambas as metodologias mencionadas funcionam bem para modificação genética de gametas, mas a transdução *in vivo* resulta em peixes que não conseguem manter

um alto nível de fluorescência nos espermatozoides produzidos ao decorrer de novos ciclos de espermatogênese, diferentemente da metodologia utilizando-se SSCs.

Assim sendo, a modificação das SSCs seguida de transplante é uma estratégia que gera animais com produção sustentada de espermatozoides modificados; uma alternativa a este protocolo demorado é a transdução *in vivo*. Entretanto, se esta técnica for a escolhida, a fecundação *in vitro* para gerar animais transgênicos completos seria realizada com uma amostra de esperma com menor teor de modificação genética (em porcentagem) em comparação com o de peixes que sofreram transplante de SSCs modificadas; e também com um esperma fluorescente de cuja produção com níveis elevados de fluorescência é apenas temporária.

Referências bibliográficas

1. Maclean, N. & Talwar, S. Injection of cloned genes with rainbow trout eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* **82**, 87-92 (1984).
2. Rahman, M.A. & Maclean, N. Production of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-cell-stage microinjection. *Aquaculture.* **105**, 219-232 (1992).
3. Palmiter, R.D.B. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature.* **300**, 611-615 (1982).
4. Dunham, R.A., Eash, J., Askins, J. & Townes, T.M. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *T. Am. Fish Soc.* **116**, 87-91 (1987).
5. Brem, G., Brenig, B., Hörstgen-Schwark, G. & Winnacker, E.L. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* **68**, 209-219 (1988).
6. Stripecke, R. & Kasahara, N. Lentiviral and Retroviral Vector Systems, in: Hunt, K.K., Vorburger, S.A. & Swisher, S.G. (Eds.), *Gene Therapy for Cancer Humana Press, Totowa*, pp. 39-71 (2007).
7. Tonelli, F.M.P. et al. Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials. *RSC Adv.* **6**, 52636-52641 (2016).