



TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR ESPERMATOZÓIDES

Espermatozóide Como Vetor de DNA Exógeno na Produção de Animais Transgênicos

Ilustrações cedidas pelos autores

INTRODUÇÃO

Animais geneticamente modificados são definidos como aqueles que apresentam DNA de origem exógena, introduzido por manipulação genética (JACENKO, 1997). Apesar dos primeiros experimentos terem sido conduzidos em ratos, durante os últimos 15 anos, os estudos realizados em animais de laboratório têm sido extrapolados para animais de interesse zootécnico (PINKERT; MURRAY, 1999). Assim, a transferência gênica é utilizada na produção de modelos para estudos básicos ou aplicados, no desenvolvimento de animais com alto valor genético adicionado, na produção de animais para uso industrial ou farmacêutico e na produção de órgãos para xenotransplante.

Para a geração destes animais, são utilizadas três metodologias principais: injeção de DNA exógeno em pró-núcleos de zigotos; produção de quimeras por modificação de célula-tronco embrionária e, mais recentemente, transferência nuclear. Para esta última, células somáticas cultivadas *in vitro* são modificadas geneticamente e posteriormente fundidas com oócitos receptores enucleados (MCCREATH et al., 2000). Estudos sobre a produção de animais transgênicos têm sido desenvolvidos intensivamente e com sucesso em camundongos e ratos (CHARREAU et al., 1996). Entretanto a adaptação e a utilização destas técnicas em animais domésticos continuam problemáticas (WALL et al., 1997), apresentando baixa integração do transgene (EYESTONE, 1994).

Para contornar estas dificuldades, o uso de espermatozoides como vetor de DNA na produção de animais transgênicos tem sido empregado

como método alternativo. A primeira evidência de que espermatozoides de mamíferos são capazes de se ligarem às moléculas de DNA exógeno ocorreu há 34 anos (BRACKETT et al., 1971). Entretanto devido ao início das pesquisas em biologia molecular e fecundação *in vitro*, estes achados foram esquecidos até o final da década de 80. Lavitrano et al. (1989) e Arezzo et al. (1989) mostraram que espermatozoides comportam-se como vetores, transferindo DNA exógeno para o interior de oócitos durante o processo de fecundação e mais especificamente que células espermáticas do epidídimo absorvem espontaneamente DNA plasmidial. Este achado foi confirmado posteriormente por vários grupos (ATKINSON et al. 1991; CASTRO et al., 1991; HORAN et al., 1991; GAGNÉ et al., 1991).

A transferência gênica mediada por espermatozóide (TGME) oferece uma poderosa ferramenta para a transgenia animal e a biotecnologia nas espécies em que a reprodução ocorre por gametas, principalmente naquelas em que as técnicas convencionais apresentam baixa eficiência, como suínos e bovinos. Esta revisão se propõe a discorrer sobre a produção de animais transgênicos utilizando o espermatozóide como vetor de DNA exógeno, abordando aspectos como a interação de DNA exógeno com as células espermáticas e a sua internalização no núcleo do espermatozóide.

INTERAÇÃO

A interação do DNA exógeno com células espermáticas é um evento iônico. Lavitrano et al. (1992), ao incubarem espermatozoides com moléculas de DNA entre 150bp e 7 kb, ob-

Weber Beringui Feitosa

Médico Veterinário, Mestrando em Reprodução Animal, FMVZ, USP

Marcella Pecora Milazzotto

Bióloga, Doutoranda em Biotecnologia, USP

José Antonio Visintin

Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP

Mayra Elena Ortiz d'Ávila Assumpção

Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP

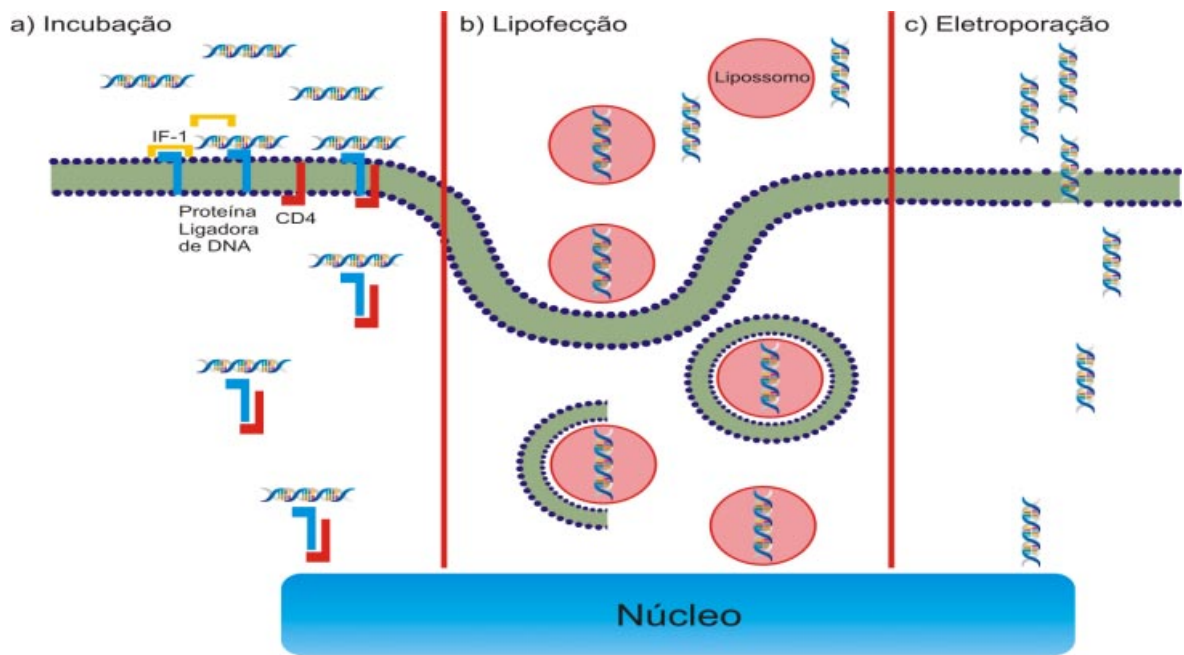


Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos de transfecção de células espermáticas. a) Incubação dos espermatozoides com o DNA exógeno. Após a lavagem do sêmen para a retirada do plasma seminal contendo o fator de inibição IF-1, as moléculas de DNA exógeno se ligam a proteínas ligadoras de DNA (PLDNA) presentes na membrana do espermatozoide, o que ativa a internalização do DNA exógeno mediada por moléculas de CD4, representada pelo complexo DNA/PLDNA/CD4. b) Na lipofecção, a carga positiva do lipossomo interage com a carga negativa do DNA exógeno formando lipoplexos que sofrem endocitose sendo carregados para o núcleo. c) Pulsos elétricos alternados na eletroporação, abrem poros na membrana plasmática do espermatozoide facilitando a internalização do DNA exógeno.

servaram que moléculas maiores se ligam mais eficientemente aos espermatozoides do que as moléculas menores. Isto exclui a possibilidade da internalização do DNA no espermatozoide ser devido simplesmente à sua permeabilidade através dos poros, pois desta forma, moléculas pequenas seriam favorecidas em relação as maiores. Tal fato sugere que a carga das moléculas pode ter função importante na interação do DNA exógeno com células espermáticas. De fato, moléculas carregadas negativamente parecem ser favorecidas molecularmente em suas interações específicas, já que uma dada quantidade de carga é necessária para completa ligação e ou internalização.

Segundo Camaioni et al. (1992), o DNA é mais comumente detectado no segmento equatorial e na região pós-acrossomal dos espermatozoides de camundongos e uma minoria, na região apical do acrossoma, o mesmo ocorrendo em espermatozoides de bovinos, suínos e humanos. A locali-

zação específica da ligação do DNA exógeno na região pós-acrossomal do espermatozoide somado à relevância da carga na interação entre o DNA exógeno e o espermatozoide sugerem a existência de um substrato, possivelmente uma proteína na cabeça dos espermatozoides, no qual moléculas negativamente carregadas podem se ligar. Lavitrano et al. (1992) encontraram proteínas de 30 a 35 kDa na cabeça dos espermatozoides.

Resultados semelhantes foram encontrados por Zani et al. (1995) que ao pesquisarem o mecanismo envolvido na interação DNA-espermatozoide, identificaram três classes de proteínas como potenciais substratos para a interação do DNA exógeno com o espermatozoide. A primeira classe é uma proteína de baixo peso molecular, abaixo de 20 kDa que foi classificada como protamina. A segunda classe é uma proteína de peso molecular entre 30 e 35 kDa e a terceira classe, de peso molecular em torno de 50 kDa. Estas proteínas estão presentes

na região da cabeça dos espermatozoides atuando como substrato para a ligação do DNA exógeno, formando um complexo estável (SPADAFORA 1998). As proteínas de 30-35 kDa representam o mais provável substrato fisiológico para a ligação do DNA, visto que é o único grupo no qual a mobilidade eletroforética é conservada entre espécies de mamíferos tanto quanto em peixes e equinodermes. Além do mais, é a única classe de proteínas acessíveis ao DNA exógeno em células espermáticas intactas. As proteínas de 30 a 35 kDa purificadas interagem com o DNA exógeno gerando complexo proteína/DNA. Estes resultados sugerem que a interação do DNA exógeno com o espermatozoide é específica e mediada por fatores protéicos em que o DNA exógeno se liga para ser carregado para o núcleo.

Outra molécula que atua na ligação do DNA exógeno com o espermatozoide é o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Espermatozoides de camundongo

knockout para MHC da classe II apresentaram redução na ligação com o DNA exógeno. Embora não tenha sido encontrada molécula de MHC de classe II em células espermáticas, sua expressão parece ser necessária durante a espermatogênese para produzir células espermáticas capazes de se ligarem ao DNA exógeno (LAVITRANO et al., 1997).

Por outro lado, existem também moléculas que atuam como reguladores negativos no processo de interação do DNA exógeno com espermatozóide. A alta permeabilidade de células espermáticas ao DNA exógeno faz da fecundação um risco para a identidade genética da prole. Entretanto, isto é incomum na natureza. Em contraste ao que acontece com células espermáticas do epidídimo, espermatozoides do ejaculado na presença de plasma seminal são impermeáveis ao DNA exógeno, sugerindo que o plasma seminal possui fatores que inibem a permeabilidade dos espermatozoides.

A hipótese da existência de fatores de inibição no plasma seminal foi confirmada por Lavitrano et al. (1992) que, ao acrescentarem quantidades crescentes de plasma seminal, obtiveram taxas decrescentes da ligação dos espermatozoides com o DNA exógeno. O mesmo efeito do plasma seminal foi observado por Camaioni et al. (1992), que relataram aumento na porcentagem de espermatozoides ligados ao DNA exógeno quando o sêmen foi lavado antes da exposição ao DNA. De fato, o plasma seminal possui fator que antagoniza fortemente a ligação do DNA exógeno, protegendo os espermatozoides. Posteriormente, o fator inibitório de ligação do DNA exógeno às células espermáticas foi identificado e caracterizado como uma glicoproteína, chamado de Fator Inibitório 1 (IF-1). Este provavelmente se une às proteínas ligadoras de DNA exógeno dos espermatozoides, inibindo a interação DNA exógeno-espermatozoides (ZANI et al. 1995). Estas proteínas ligadoras de DNA e o IF-1 aparentemente possuem alta afinidade, sendo que moléculas de IF-1 foram capazes de remover DNA exógeno já associados às proteínas ligadoras de DNA.

Carbalada e Esponda (2001) descreveram dois outros fatores que atu-

am como reguladores negativos na interação do DNA exógeno com os espermatozoides. O primeiro é o fluido da vesícula seminal, que possui forte atividade de DNase dependente de cálcio e magnésio. Este achado não é surpresa, pois já foi descrita a presença de DNase no sêmen bovino (TANIGAVA et al., 1975), estando também presente no ejaculado de muitas espécies mamíferas (MAMM; LUTWAK-MAMM, 1981). Provavelmente a DNase é responsável pela maior atividade inibitória no plasma seminal. Carbalada e Esponda (2001) observaram forte correlação entre a atividade de DNase e a habilidade desta atividade em inibir a interação DNA/espermatozóide. O segundo fator é o fluido da próstata ventral que exibe uma moderada atividade inibitória, o qual possui proteínas ligadoras de DNA que se ligam ao DNA exógeno. Todas as proteínas são encontradas em níveis muito baixo, especialmente aquelas entre 50 e 80 kDa. A mais abundante são as proteínas de 25kDa, porém sua afinidade não é muito alta. De qualquer modo, a contribuição destas proteínas na inibição da interação do DNA com os espermatozoides são irrelevantes quando comparadas com a atividade da DNase (CARBALADA; ESPONDA, 2001)

INTERNALIZAÇÃO

A proporção de DNA internalizado no núcleo do espermatozóide ocorre em proporção constante como observado por microscopia eletrônica (FRANCOLINI et al. 1993), em que 15 a 20% do DNA ligado ao espermatozóide foram eficientemente internalizados no núcleo dos espermatozoides e coberto pela cromatina. A internalização no núcleo também foi confirmada por microscopia confocal (BACHILLER et al., 1991) e análise bioquímica (ATKINSON et al., 1991). Lavitrano et al. (1997) relatam que o CD4 iniciam um importante papel na internalização do DNA. Camundongos *knockout* para CD4 apresentaram eficiência igual de ligação do DNA exógeno ao espermatozóide em comparação aos camundongos normais, porém foram incapazes de internalizá-los no núcleo. O índice de internalização constante somado com a localização específica da ligação do DNA

exógeno na região sub-acrossomal do espermatozóide e o papel das moléculas de CD4 sugerem que a internalização do DNA exógeno no núcleo espermático provavelmente não é consequência de um processo passivo e incontrolado, mas provavelmente mediado por mecanismos regulatórios.

Zoraqui e Spadafora (1997) observaram que o DNA plasmidial internalizado torna-se fortemente associado com o núcleo, é extensivamente reorganizado e sofre recombinação com o DNA genômico do espermatozóide. Estes mesmos autores construíram uma biblioteca genômica usando o DNA extraído de espermatozoides previamente incubados com o plasmídeo pSV₂CAT, o que gerou o isolamento de diversos clones em que a seqüência do plasmídeo foi recombinada com o DNA cromossomal de camundongo. Entre os clones, dois foram selecionados aleatoriamente (7 e 8,5 kb) e seqüenciados. Em ambos, a seqüência do DNA plasmidial foi integrada na seqüência genômica de células espermáticas de camundongo. Os locais de integração foram identificados nos dois clones analisados, sendo flanqueados por seqüências idênticas, sugerindo que estes eventos não ocorrem aleatoriamente, mas em locais preferenciais. Uma seqüência de topoisomerase II consenso foi encontrada adjacente aos finais dos locais de integração, sugerindo um possível papel desta enzima no processo de recombinação homóloga.

Pittogi et al. (2000) sugerem a hipótese de que há integração de retroposons e moléculas de DNA exógeno nas nucleohistonas no espaço da cromatina entre dois domínios de protaminas adjacentes. O nucleossoma da cromatina espermática interage com o esqueleto nuclear e é abastecido com a maquinaria enzimática necessária para suportar a integração do DNA.

FATORES QUE AFETAM A INTERAÇÃO

Não é apenas o DNA exógeno que se liga à região pós acrossomal do espermatozóide, mas também outras macromoléculas carregadas negativamente como a heparina, sulfato de dextram e outras proteínas com pon-

to isoeletrico menor que 7 (LAVITRANO et al., 1992). Em particular, a c-phycocyanina, a albumina sérica bovina e a b-lactoglobulina B, os quais o ponto isoeletrico variam de 4,6 a 5,1, mostraram ligação preferencial na parte posterior da cabeça, região correspondente ao núcleo, em padrão muito similar aos obtidos com moléculas de DNA. Esta ligação é reversível e moléculas de DNA ligadas ao espermatozóide podem ser removidas quando se aumenta excessivamente a concentração destas moléculas.

A quantidade de DNA exógeno incubado com as células espermáticas também possui importante papel na internalização. Plasmídeos extraídos de células espermáticas após incubação com baixas doses de DNA permaneceram intactos. Entretanto o DNA exógeno foi altamente degradado quando células espermáticas foram incubadas com altas doses de DNA exógeno. Estes resultados indicam que o espermatozóide do epidídimo reage contra a invasão do DNA exógeno por meio de atividade de nuclease, promovendo sua degradação. Quando é incubado com grande quantidade de DNA exógeno, o espermatozóide sofre processo semelhante a apoptose (ativada pela internalização do DNA), degradando o DNA exógeno e o genômico (MAIONE et al., 1997).

A endonuclease, por degradar o DNA exógeno e o endógeno, exerce papel negativo na interação do DNA com as células espermáticas, razão pela qual se dá atenção à temperatura de incubação dos espermatozoides para não haver ativação desta enzima por temperaturas altas. O cálcio também possui efeito na interação. Na capacitação espermática, evento dependente de cálcio, ocorre grande número de mudanças fisiológicas, tornando o espermatozóide competente para a fecundação e que deve ocorrer no seu ritmo normal. Entretanto a remoção do plasma seminal (etapa fundamental na interação do DNA exógeno com o espermatozóide) acelera a capacitação espermática, diminuindo a internalização do DNA exógeno no espermatozóide. Uma maneira de inibir esta aceleração é a utilização de meio de incubação sem cálcio, o que permite a capacitação espermática mais lenta na ausência do

PROTOSCOLOS EMPREGADOS NA TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR ESPERMATOZÓIDE

INCUBAÇÃO

- Suspender os espermatozoides em meio de fecundação *in vitro* (sem heparina) na concentração de 5×10^6 /ml
- Incubar por 1 hora a 39°C e 5% de CO_2 em ar com 500 ng/ml de DNA
- Inseminar os oócitos

ELETROPORAÇÃO

- Colocar o sêmen (5×10^6) com o DNA (500ng) na cubeta de eletroporação
- Incubar por 10 minutos
- Provocar o choque de 500V
- Incubar por 10 minutos
- Centrifugar em meio de Incubação (Meio 199 com hepes + BSA + piruvato + antibiótico) por 5 minutos a 200g
- Centrifugar em meio de fecundação *in vitro* por 5 minutos a 200g
- Inseminar os oócitos

LIPOFECCÃO

- Adicionar o DNA (500ng) em 4ml de solução para condensação do DNA (disponível em vários kits comerciais de lipofecção)
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
- Adicionar 10ml de lipossomo
- Misturar vigorosamente por 10 minutos
- Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente
- Acrescentar meio de fecundação até completar o volume de 270ml
- Adicionar 30ml de meio de incubação (Meio 199 com hepes + BSA + piruvato + antibiótico) contendo 5×10^6 espermatozoides por ml
- Incubar por 2 horas em estufa
- Centrifugar em meio de incubação por 5 minutos a 200g
- Centrifugar em meio de fecundação *in vitro* por 5 minutos a 200g
- Inseminar os oócitos

plasma seminal (Lavitrano et al., 2003).

Outro fator é a variação individual. Lavitrano et al. (2003) encontraram diferenças que variaram de 9% a 67% nos índices de ligação de DNA exógeno com espermatozoides suínos em diferentes animais. Esta associação foi alterada quando diferentes concentrações de DNA exógeno foram adicionadas. Entretanto, sob as mesmas condições, a cinética de associação foi similar. Em todos os casos, a associação do DNA com o espermatozóide iniciou entre 15 e 30 minutos de incubação seguido de uma fase platô aos 60 minutos. Estes resultados mostraram que para cada animal, a ligação do DNA exógeno com o espermatozóide deve ser otimizada. Para otimizar o protocolo de geração de animais transgênicos, é necessário estabelecer quando, por quanto tempo e qual a quantidade de

DNA exógeno deve ser adicionada aos espermatozoides, para que este seja eficientemente ligado e internalizado pela maioria das células espermáticas. Isto sugere que os laboratórios que trabalham com transferência gênica mediada por espermatozoides devam realizar vários testes de padronização antes de iniciar os experimentos.

PRODUÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES "TRANSGÊNICOS"

Para a internalização do DNA exógeno nas células espermáticas, as metodologias mais utilizadas são a incubação dos espermatozoides com moléculas de DNA, a eletroporação e a lipofecção (figura 1). Na incubação, as moléculas de DNA exógeno se ligam nas proteínas ligadoras de DNA presentes na membrana do esperma-

tozóide, formando o complexo proteína/DNA, que se liga a molécula CD4 ativando a internalização do DNA exógeno. Na eletroporação, a corrente gerada por pulso elétrico alternado é capaz de abrir temporariamente poros na membrana celular, facilitando a entrada do material genético nas células. Na lipofecção, a carga positiva do lipídeo catiônico forma interação eletrostática com o fosfato do DNA, formando o lipoplexo. A carga positiva do lipoplexo forma interação não específica com a carga negativa da superfície celular, ocorrendo endocitose, permitindo a internalização do lipoplexo, que é direcionado para próximo da região perinuclear onde ocorre a dissociação, resultando na separação do DNA, o qual entra no núcleo provavelmente por transporte nuclear dependente de energia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tabela 1: Resumo dos resultados na literatura com a transferência gênica mediada por espermatozóide

Espécie	Metodologia	Referência
Camundongo	Incubação	Lavitrano et al., 1989
	Incubação	Maione et al., 1998
	Incubação	Chang et al., 2002
Bovino	Eletroporação	Gagné et al., 1991
	Incubação	Schellander et al., 1995
	Incubação	Sperandio et al., 1996
	Lipofecção	Rotmann et al., 1996
	Eletroporação	Rieth et al., 2000
Suíno	Incubação	Sperandio et al., 1996
	Incubação	Habrova et al., 1996
	Incubação	Lavitrano et al., 2003
Coelho	Incubação	Brackett et al., 1971
	Incubação	Kuznetsov; kuznetsova, 1995
	Lipofecção	Rotman et al., 1996
	Lipofecção	Wang et al., 2003
Salmão	Eletroporação	Sin FYT et al., 2000
	Eletroporação	Symonds et al., 1994
Zebrafish	Incubação	Khoo et al., 1992
	Eletroporação	Patil; khoo. 1996
Carpa	Incubação	Zkong et al., 2002
Tilápia	Eletroporação	Mueller et al., 1992
Galinha	Lipofecção	Rotman et al., 1991
	Incubação,	
	Eletroporação e	
	Lipofecção	Nakanishi; Iritani, 1993
	Lipofecção	Yang et al., 2004
Ouriço do mar	Incubação	Arezzo 1989
	Eletroporação	Tsai et al., 1997

A literatura científica contém mais de 70 relatos de sucesso sobre ligação do DNA exógeno com células espermáticas (exemplos na tabela 1). Na maioria destes relatos a transferência e manutenção do transgene após a fecundação são descritas, mostrando a subsequente geração de animais viáveis (F₀) contendo o transgene. Em alguns casos também é mostrada a transmissão do transgene para a prole (F₁) ou adiante (SMITH; SPADAFORA, 2005).

Entretanto a TGME ainda não está bem estabelecida como forma confiável de manipulação genética. Um aspecto significativo é que a integração estável do transgene tem sido detectada em níveis baixo nos protocolos de TGME. A baixa frequência de integração estável no genoma, a frequência de modificação fenotípica e a transgenia total (incluindo características transmitidas de forma epissomal) pode variar de 0 a 100%. Maione et al.

(1998), em 75 experimentos, produziram 1755 fetos de camundongo dos quais 130 eram transgênicos, representando apenas 7% do total. A eficiência não foi homogênea entre os experimentos, onde os 130 camundongos transgênicos foram originados de 13 dos 75 experimentos. Entre os 13 experimentos, a eficiência variou de 4 a 100%. Devido a grande variação nos índices de integração do DNA exógeno ao genoma hospedeiro, a TGME não é considerada método bem estabelecido de transgenia comparada a microinjeção pró-nuclear ou às células tronco embrionárias (produção de quimeras). Além disso, uma série de estudos mostrou, em espécies diferentes, a ocorrência da seqüência de DNA exógeno em embriões na fase pré-implantacional, seguido pelo desaparecimento de qualquer sinal do DNA exógeno na prole resultante, sendo esta ocorrência atribuída à transmissão epissomal do DNA exógeno.

Embora a TGME não seja uma técnica bem estabelecida, ela oferece vantagens quando utilizada em animais nos quais a microinjeção ou a utilização de células tronco embrionárias são menos eficiente. Este método não necessita de equipamentos caros nem habilidade na micromanipulação. Adicionalmente, a TGME permite a produção de animais transgênicos em massa, uma vez que grande quantidade de zigotos pode ser modificada coletivamente numa única etapa. Esta técnica poderia ser executada no campo, em programas de inseminação artificial ou em laboratório utilizando a fecundação *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Podendo ser aplicado em todas as espécies cuja reprodução é mediada por gametas.

A integração epissomal pode ser atrativa para pesquisa futura em terapia gênica. Segundo Smith; Spadafora (2005) a não integração do DNA exógeno é na maior parte propagada pelo desenvolvimento embrionário, mantida nos tecidos de animais adultos, sem interrupção da integridade do genoma hospedeiro, sugerindo que a terapia gênica, em particular em embriões e fetos, pode se tornar possibilidade futura. O potencial uso da TGME na terapia gênica embrionária

é teoricamente aceitável, considerando que transgenes parecem persistirem melhor no estágio inicial de desenvolvimento, possivelmente devido ao seu estado epissomal. Entretanto, a natureza especulativa desta possibilidade deve ser reconhecida.

A interação do DNA exógeno com células espermáticas também tem revelado funções inesperadas e atividades metabólicas nestas células, que são de outra maneira, convencionalmente consideradas silenciosas. A internalização nuclear do DNA exógeno inicia a ativação metabólica de uma variedade de enzimas endógenas, a qual causa a reorganização das seqüências de DNA exógeno e catalisa a sua recombinação com o DNA do espermatozóide (MAGANO et al., 1998).

Embora a TGME tenha alto índice de integração epissomal, existem vários relatos na literatura de produção de animais transgênicos utilizando esta técnica com integração estável no genoma hospedeiro (existem mais de 30 relatos de sucesso dos quais 25% destes mencionam a transmissão do transgêneo para F₁ ou adiante). Além disso, esta técnica apresenta vantagens como baixo custo, simplicidade, capacidade de produção de animais transgênicos em alta escala, possibilidade de ser aplicada ao campo em futuro próximo e perspectiva para uso na terapia gênica. Isto faz com que vários pesquisadores estudem a TGME com finalidade de aumentar sua eficiência, tornando-a bem estabelecida e confiável, apresentando alto índice de integração estável.

CONCLUSÃO

Moléculas de DNA exógeno podem se ligar e internalizar nos espermatozóides em processo que não pode ser visto como evento aleatório, mas sim como evento regulado por mecanismos específicos. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a internalização do DNA exógeno nos espermatozóides, onde ocorre integração epissomal ou genômica, bem como o que realmente acontece com o DNA exógeno depois que ele entra no oócito. De qualquer maneira, espermatozóides de diferentes espécies têm sido usados como vetores de DNA exógeno, produzindo

animais geneticamente modificados. Futuras pesquisas sobre transferência gênica mediada por espermatozóides incluem mecanismos que regulam a interação do DNA exógeno no núcleo, a ação da atividade da endonuclease espermática sobre o DNA exógeno, a integração do DNA exógeno no genoma quando, assim como protocolos que aumentem a eficiência da técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arezzo, F. Sea-urchin sperm as a vector of foreign genetic information. **Cell Biol Int Rep.** v. 13, p 391-404, 1989.
- Atkinson, P.W., Hines, E.R., Beaton, S., Matthaei, K.I., Reed, K.C., Bradley, M.P. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. **Mol Reprod Dev.** v. 29, p 1-5, 1991.
- Bachiller, D., Schellander, K., Peli, J., Ruther, U. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. **Mol Reprod Dev.** v. 30, p. 194-200, 1991.
- Brackett, B.G., Baranska, W., Sawicki, W. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 68, p. 353-357, 1971.
- Camaioni, A., Russo, M.A., Odorisio, T., Gandolfi, F., Fazio, V.M., Siracusa, G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa - specific localization of DNA on sperm heads. **J Reprod Fertil.** v. 96, p. 203-212, 1992.
- Carballada, R., Esponda, P. Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. **Exp Cell Res.** v. 262, p.104-113, 2001.
- Castro, F.O., Hernandez, O., Uliver, C., Solano, R., Milanés, C., Aguilar, A., Pérez, A., De Armas, R., Herrwera, L., De la Fuente, J. Introduction of foreign DNA into the spermatozoa of farm animals. **Theriogenology.** v. 34, p 1099-1110, 1990.
- Chang, K., Qian, J., Jiang, M., Liu, Y.H., Wu, M.C., Chen, C.D., Lai, C.K., Lo, H.L., Hsiao, C.T., Brown, L., Bolen, J. Jr., Huang, H.I., Ho, P.Y., Shih, P.Y., Yao, C.W., Lin, W.J., Chen, C.H., Wu F.Y., Lin, Y.J., Xu J., Wang, K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. **BMC Biotechnol.** v. 2: 5, 2002.
- Charreau, B., Tesson, L., Soullillou, J.P., Pourcel, C., Anegon, I. Transgenesis in rats: technical aspects and models. **Transgenic Res.** v. 5 p. 223-34, 1996.
- Eyestone, W.H. Challenges and progress in the production of transgenic cattle. **Reprod Fertil Dev.** v. 6, p. 647-52, 1994.
- Francolini, M., Lavitrano, M., Lamia, C.L., French, D., Frati, L., Cotelli, F., Spadafora, C. Evidence for nuclear internalization of exogenous dna into mammalian sperm cells. **Mol Reprod Dev.** v. 34, p. 133-139, 1993.
- Gagne, M.B., Pothier, F., Sirard, M.A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. **Mol Reprod Dev.** v. 29, p 6-15, 1991
- Habrova, V., Takac, M., Navratil, J., Macha, J., Ceskova, N., Jonak, J. Association of Rous sarcoma virus DNA with Xenopus laevis spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. **Mol Reprod Dev.** v. 44, p. 332-342, 1996.
- Horan, R., Powell, R., McQuaid, S., Gannon, F., Houghton, J.A. Association of foreign dna with porcine spermatozoa. **Arch Androl.** v. 26. p. 83-92, 1991.
- Jacenko, O. Strategies in generating transgenic mammals. **Methods Mol Biol.** v. 62, p. 399-424, 1997.
- 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, p. 1-19, 1992.
- Kuznetsov, A.V., Kuznetsova, I.V. Binding of exogenous DNA pRK3lacZ by the rabbit spermatozoa, its transfer in the oocytes and expression in the preimplantation embryos. **Ontogenez.** v. 26, p. 300-309, 1995.
- 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, p. 717-723, 1989.
- Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L., Spadafora, C. The Interaction between exogenous DNA and sperm cells. **Mol Reprod Dev**. v. 31, p. 161-169, 1992.
- Lavitrano, M., Maione, B., Forte, E., Francolini, M., Sperandio, S., Testi, R., Spadafora, C. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: A role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. **Exp Cell Res**. v. 233, p. 56-62, 1997.
- Lavitrano, M., Forni, M., Bacci, M.L., Di Stefano, C., Varzi, V., Wang, H., Seren, E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. **Mol Reprod Dev**. v. 64, p.284-91, 2003.
- Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R., Spadafora, C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. **DNA Cell Biol**, v. 16, p. 1087-1097, 1997
- Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora, C., Kiessling, A.A. Sperm-mediated gene transfer in mice. **Mol Reprod Dev**, v. 50, p. 406-409, 1998
- Magnano, A.R., Giordano, R., Moscufo, N., Baccetti, B., Spadafora, C. Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome. **J Reprod Immunol**. v. 41, p. 187-196, 1998.
- Mann, T., Lutwak-Mann, C.. Male Reproductive Function and Semen, **Springer-Verlag**, Berlin (1981)
- McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H., Colman, A., Schnieke, A.E., Kind, A.J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**. v. 405, p.1066-1069, 2000.
- Muller, F., Ivies, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvath, L., Maclean, N. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier, **Mol Mar Biol Biotech**. v. 1, p. 276-281, 1992.
- Nakanishi, A., Iritani, A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods, **Mol Reprod Dev**. v. 36, p. 258-261, 1993.
- Patil, J.G., Khoo, H.W. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. **J Exp Zool**. v. 274, p. 121-129, 1996.
- Pinkert, C.A., Murray, J.D. Transgenic farm animals in **transgenic animals in agriculture**. Ed. CAB international, N.Y. 1999.
- Pittoggi, C., Zaccagnini, G., Giordano, R., Magnano, A.R., Baccetti, B., Lorenzini, R., Spadafora, C. Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retroposition and foreign DNA integration. **Mol Reprod Dev**. v. 56, p. 248-251, 2000.
- Rieth, a., Pothier, F., Sirard, M.C. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. **Mol Reprod Dev**. v. 57, p. 338-345, 2000.
- Rottmann O.J., Antes, R., Hofer, P., Maierhofer, G. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. **J Anim Breed Genet**. v. 109, p. 64-70, 1991.
- Rottmann O.J., Antes, R., Hofer, P., Sommer, B., Wanner, G., Gorchach, A., Grummt, F., Pirchner, F. Liposome-mediated gene transfer via sperm cells. High transfer efficiency and persistence of transgenes by use of liposomes and sperm cells and a murine amplification element. **J Anim Breed Genet**.v. 113, p. 401-411, 1996.
- Spadafora, C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. **Bioessays**. v. 20, p. 955-964, 1998.
- Schellander, K., Peli, J., Schmoll, F., Brem, G. Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. **Anim Biotechnol**. v. 6, p. 41-50, 1995.
- Sin, F.Y.T., Walker, S.P., Sin, I.L., Symonds, J.E., Mukherjee, U.K., Khoo, J.G.I. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: Efficiency, reliability, and fate of transgene. **Mol Reprod Dev**. v. 56, p. 285-288, 2000.
- Symonds, J.E., Walker, S.P., Sin, F.Y.T. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA - evidence of enhanced sperm DNA association. **Aquaculture**. v. 119, p. 313-327, 1994.
- Smith, K., Spadafora, C. Sperm-mediated gene transfer: Applications and implications. **Mol Reprod Dev**. v. 25, p. 551-62, 2005
- Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M.L., Forni, M., Maione, B., Spadafora, C., Lavitrano, M.L. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. **Anim Biotechnol**. v. 7, p. 59-77, 1996.
- Tanigawa, Y., Yoshihara, K., Koide, S.S. Endonuclease activity in bull semen, testis and accessory sex organs. **Biol. Reprod**. v. 12, p. 464-470, 1975.
- Tsai, H.J., Lai, C.H., Yang, H.S. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor* ssp. *texta*). **Transgenic Res**. v. 6, p. 85-95, 1997
- Zani, M., Lavitrano, M., French, D., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S., Spadafora, C. The Mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells - factors controlling the DNA uptake. **Exp Cell Res**. v. 217, p. 57-64. 1995
- Zhong, J.Y., Wabg, Y.P., Zhu, Z.Y. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. **Aquaculture**. v. 214, p. 93-101, 2002.
- Zoraqi, G., Spadafora, C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. **DNA Cell Biol**. v. 16, p. 291-300, 1997.
- Wall, R.J. New gene transfer methods. **Theriogenology**, v. 57, p. 189-201, 2002.
- Wang, H.J., Lin, A.X., Chen, Y.F., Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. **Anim Biotechnol**. v. 14, p. 155-165, 2003
- Yang, C.C., Chang, H.S., Lin, C.J., Hsu, C.C., Cheung, J.L., Hwu, L., Cheng, W. T. K. Cock Spermatozoa Serve as the Gene Vector for Generation of Transgenic Chicken (*Gallus gallus*). **Asian-australas. J. Anim. Sci**. v. 17, p. 885-891, 2004