

PARÂMETROS SEMINAIS DE CAPRINOS TRANSGÊNICOS E NÃO TRANSGÊNICOS PARA O FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS HUMANO

(Seminal parameters of transgenic and non transgenic goats for the human granulocyte colony facto)

Beatriz Mano e SILVA*¹; Luiz Antonio Moreira MIRANDA¹; Thais Thatiane dos Santos SOUZA¹; Wasim Al SHEBLI¹; Luciana Magalhães MELO^{1,2}; Vicente José de Figueirêdo FREITAS¹

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Fortaleza, CE. CEP: 60.740-000. ²Curso de Medicina Veterinária (UNIFAMETRO). *E-mail: beatriz.mano@aluno.uece.br

RESUMO

A espécie caprina tornou-se um excelente modelo animal objetivando a produção de proteínas recombinantes no leite. A obtenção de machos fundadores transgênicos é importante, pois os mesmos permitem aumentar o número de crias transgênicas pelo simples uso da inseminação artificial. Este trabalho teve por objetivo, comparar parâmetros seminais de machos caprinos transgênicos (TG) e não transgênicos (NTG) para o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano (hG-CSF). Para tanto, semanalmente, foram colhidas amostras de sêmen de todos os animais através de vagina artificial. Foram avaliados os seguintes parâmetros: volume, motilidade massal, concentração espermática, motilidade individual progressiva (MIP), vigor e patologias espermáticas. Foram observadas diferenças estatísticas somente para volume e MIP, os quais tiveram valores superiores ($p < 0,05$) nos animais TG. Observou-se também, em ambos os grupos, um pequeno percentual de patologias espermáticas (<2%), sem diferença estatística ($p > 0,05$). Em conclusão, a presença do transgene não afetou a qualidade do sêmen favorecendo e contribuindo para a formação de um rebanho transgênico.

Palavras-chave: Caprinos transgênicos, sêmen, espermatozoide, proteína recombinante.

ABSTRACT

Goats became an excellent animal model aiming the production of recombinant proteins in the milk. Transgenic founder males are important to increase the number of transgenic kids by artificial insemination. This work aimed to compare seminal parameters of transgenic (TG) and non-transgenic goats (NTG) for the human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF). Thus, weekly, semen samples were collected from all transgenic males by artificial vagina and evaluated: volume, mass motility, sperm concentration, individual progressive motility (IPM), vigor and sperm pathologies. Statistical differences were observed only for volume and IPM, which had higher values ($p < 0.05$) in TG animals. There were also a small percentage of sperm pathologies (<2%) in both groups, with no statistical difference ($p > 0.05$). In conclusion, the presence of the transgene did not affect the semen quality and these animals can be used to obtain kids and enable to create of a transgenic herd.

*Endereço para correspondência:
beatriz.mano@aluno.uece.br

Key words: Transgenic bucks, semen, spermatozoa, recombinant protein.

INTRODUÇÃO

A transgenia é uma ferramenta importante em estudos experimentais e biologia aplicada, que pode ser usada para alterar características de animais modificando diretamente o material genético. Em geral, é um procedimento pelo qual o gene ou parte do gene de um indivíduo é incorporado ao genoma do outro (MONTALDO *et al.*, 2006). Pode ser identificada simplesmente como uma transferência de um gene exógeno em um genoma hospedeiro (BACCI *et al.*, 2007).

No início da década de 80, pesquisadores obtiveram, através da técnica de microinjeção no pró-núcleo de embriões, o primeiro animal transgênico: um camundongo (GORDON *et al.*, 1980). Anos mais tarde, foram obtidas crias transgênicas em espécies de produção, tais como coelhos, suínos, ovinos (HAMMER *et al.*, 1985; WRIGHT *et al.*, 1991; VELANDER *et al.*, 1992), bovinos (KRIMPENFORT *et al.*, 1991) e caprinos (EBERT *et al.*, 1991).

A transgênese tem sido utilizada com diferentes propósitos, tais como, estudo dos mecanismos de regulação gênica e biologia do desenvolvimento, xenotransplante, melhoramento zootécnico e, sobretudo, produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico (WALL *et al.*, 1997; WHEELER, 2003; MONTOLIU e LAVADO, 2005).

Os animais de produção apresentam vantagens significativas para a produção de proteínas recombinantes, incluindo seu potencial para geração em larga escala, eficiência de glicosilação e modificações pós-traducionais, baixos custos operacionais, rápida propagação dos fundadores transgênicos e alta estabilidade de expressão. Ademais, a utilização desta técnica na espécie caprina apresenta como vantagens um menor custo de manutenção, maturidade sexual mais precoce e um curto período gestacional, quando comparada aos bovinos (FREITAS, 2003). Em animais, dentre os locais mais promissores para a produção de proteínas recombinantes, a glândula mamária recebe destaque devido à sua capacidade de produção e facilidade de obtenção das proteínas (NIEMANN e KUES, 2007).

Uma das proteínas humanas mais interessantes para produção farmacêutica é o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF), o qual modula as defesas imunitárias baseadas em neutrófilos, devido ao seu papel de regulador no crescimento, diferenciação, sobrevivência e ativação de neutrófilos e seus precursores (BARREDA *et al.*, 2004). Além disso, o hG-CSF tem sido o fator de crescimento hematopoiético mais amplamente utilizado, sendo sua aplicação conduzida como proposta de melhoria da neutropenia, como em casos de mielossupressão após quimioterapia para tratamento de neoplasias, transplante de medula óssea ou associada à anemia aplástica, síndrome mielodisplática e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SMITH, 2003).

Nosso grupo de pesquisa obteve um casal de caprinos fundadores transgênicos para o hG-CSF, utilizando o método de microinjeção em embriões pró-nucleares (FREITAS *et al.*, 2012). Uma vez que uma cabra transgênica é gerada, e a expressão correta do transgene no sítio-alvo é comprovada, a propagação de um rebanho

*Endereço para correspondência:
beatriz.mano@aluno.uece.br

transgênico, de acordo com a demanda pela proteína de interesse, pode ser iniciada. Segundo Keefer (2004), os fundadores do sexo masculino podem propagar seu material genético facilmente usando técnicas simples de reprodução como a inseminação artificial (IA). Além disso, pode-se lançar mão da criopreservação de sêmen do animal fundador servindo como um reservatório de genes de interesse e permitindo que a estrutura e funcionalidade dos espermatozoides sejam mantidas, conservando-as reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico até o momento da IA (BLASH *et al.*, 2005).

Desta forma, este trabalho objetivou realizar uma avaliação de diversos parâmetros seminais em caprinos, comparando os dados obtidos em animais não transgênicos e transgênicos para o hG-CSF, a fim de verificar algum efeito negativo da presença do transgene sobre tais parâmetros.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais e colheita de sêmen

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE, nº 1672976/2017). Para a realização do experimento, foram utilizados três machos da espécie caprina da raça Canindê, apresentando peso corporal de 42 a 54 kg e idade de 8 a 10 anos, sendo dois transgênicos (TG) e um não transgênico (NTG) como controle. Os animais foram mantidos em apriscos suspensos e sob condições controladas de alimentação e manejo. A colheita de sêmen foi realizada semanalmente pelo método de vagina artificial com o auxílio de uma fêmea em estro.

Parâmetros seminais

Para todos os animais foram verificados os seguintes parâmetros: volume do ejaculado, motilidade massal, concentração espermática, motilidade individual progressiva (MIP), vigor e patologia espermática. O volume do ejaculado foi verificado no tubo de colheita graduado em mililitros (mL). A motilidade massal foi examinada a partir de uma gota de sêmen (20 µL) sobre uma lâmina mantida em mesa aquecedora (37 °C) e em microscópio de luz direta (Nikon E400, Tóquio, Japão) em aumento de 40×. Este parâmetro foi avaliado de forma subjetiva e expresso em uma escala (0-5), onde “0” representava a amostra sem movimento e “5” aquela com acentuado movimento de massa (BARIL *et al.*, 1993).

Para determinação da concentração espermática, uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi diluída em 8 mL de solução salina formolizada para a contagem de células na câmara de Neubauer (BARIL *et al.*, 1993). De acordo com o valor obtido, as amostras de sêmen foram diluídas em meio específico para a espécie (Tab. 01), a fim de ajustar a concentração espermática para 40×10^6 espermatozoides/mL e avaliar os parâmetros de MIP e vigor. A MIP foi determinada de forma subjetiva em microscópio de luz direta em aumento de 400×, utilizando uma gota de sêmen diluído entre lâmina e laminula mantidas em mesa aquecedora a 37 °C. O valor da MIP foi dado em percentual de espermatozoides

*Endereço para correspondência:
beatriz.mano@aluno.uece.br

com movimento retilíneo. Já o vigor foi classificado em uma escala de 1 a 5 quanto à intensidade do movimento espermático (CBRA, 2013).

Tabela 1: Composição do diluente de sêmen utilizado para a espécie caprina.

Reagente	Quantidade
Glicose anidra	194 mg
Leite em pó desnatado	10 g
Pentabiótico Veterinário 1.200,000 UI (Zoetis)	25 µL
Água bidestilada	100 mL

No que se refere à avaliação da patologia dos espermatozoides, esta foi através de esfregaços de sêmen diluído e corado com eosina-nigrosina. Uma gota de sêmen diluído (20 µL) foi depositada em uma lâmina previamente aquecida (37 °C) e homogeneizada com uma gota de igual volume do corante. Após a secagem ao ar, um total de 200 espermatozoides de cada lâmina foi observado para avaliação de anormalidades morfológicas em microscópio de luz direta com aumento de 1000×. Os achados foram expressos em porcentagem. Não foi utilizado o formol salina, por uma questão de decisão do ponto de vista prático, levando-se em consideração que o sêmen já tinha sido diluído para avaliação da motilidade.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA, e para comparação das médias foi utilizado o teste *t* de Student do pacote estatístico Prism 7 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os dados estão apresentados como média±EMP. Para todos os parâmetros foi utilizado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após um período inicial de adaptação dos machos à colheita em vagina artificial, todos os animais realizaram a monta e ejacularam normalmente. A única exceção foi o macho NTG, o qual apresentou uma libido inferior aos demais. Os dados relativos aos parâmetros seminais de ambos os grupos estão apresentados na Tab. 02.

Tabela 2: Média (±EPM) para volume, motilidade massal, concentração espermática, motilidade individual progressiva (MIP) e vigor de caprinos não transgênicos (NTG) e transgênicos (TG) para o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano.

Grupo	Volume (mL)	Motilidade massal (0-5)	Concentração ($\times 10^9$ /mL)	MIP (%)	Vigor (0-5)
TG	1,26±0,08 ^a	4,10±0,11 ^a	7,88±0,41 ^a	79,17±2,04 ^a	3,88±0,13 ^a
NTG	0,99±0,06 ^b	4,23±0,14 ^a	7,99±0,48 ^a	64,58±7,8 ^b	3,87±0,22 ^a

*Endereço para correspondência:
beatriz.mano@aluno.uece.br

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos somente para os parâmetros de volume e MIP, sendo os valores superiores detectados nos animais TG. De acordo com Roca *et al.* (1992), em caprinos, o volume é um parâmetro secundário a ser observado. No entanto, os autores sugerem que a MIP seja uma variável mais relacionada com a fertilidade pós-IA.

De forma interessante, observou-se um valor muito elevado da concentração espermática em ambos os grupos. Fato este, que provavelmente deve ter sido devido às condições de criação, ou seja, manejo intensivo com oferta de feno de qualidade e ração de alto valor proteico, além de que, os machos não eram utilizados de forma exaustiva.

No que se refere às patologias espermáticas, foi observado um pequeno percentual de formas patológicas em ambos os grupos, sendo $1,50 \pm 0,21\%$ e $1,17 \pm 0,19\%$ para TG e NTG, respectivamente (Fig. 01). Estes valores estão de acordo com o adequado para a espécie caprina, de no máximo, 20% (CBRA, 2013).

Blom (1973) propôs associar a classificação ao grau de importância do defeito para a fertilidade em defeitos maiores e menores dependendo da relevância para a fertilidade reduzida em machos de diferentes espécies domésticas. Do total de células avaliadas em microscopia, 102 apresentavam anomalias; sendo que 14,28% dos defeitos espermáticos encontrados foram caracterizados como maiores e 86,47% como menores.

Os resultados, como um todo, indicam que em ambos os grupos (TG e NTG) produziram sêmen com a qualidade suficiente para criopreservação e posterior IA, ou para uso em monta natural ou IA com sêmen fresco (LEBOEUF *et al.*, 2000).



Figura 01: Representação das principais patologias espermáticas encontradas em caprinos não transgênicos (NTG) e transgênicos (TG) para o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano (hG-CSF).

Obs.: Gota citoplasmática proximal (A), cauda dobrada (B) e gota citoplasmática distal (C).

CONCLUSÃO

Os dados obtidos nos permitem afirmar que a presença do transgene não afeta a qualidade do sêmen, a qual foi, na maioria dos parâmetros, igual ou superior à dos animais NTG. Dessa forma, tais animais podem ser utilizados no intuito de obter crias transgênicas para o hG-CSF e possibilitar a formação de um rebanho transgênico.

*Endereço para correspondência:
beatriz.mano@aluno.uece.br

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

- BACCI, M.L. A brief overview of transgenic farm animals. *Veterinary Research Communications*, v. 31, p 9–14, 2007.
- BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBŒUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Rome: FAO, p.231, 1993.
- BARREDA, D.; HANINGTON, P.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and Comparative Immunology*, v.28, p.509-554, 2004.
- BLASH, S.; CHEN, L.; HARVEY, M.; GAVIN, W.G. Reestablishment of a transgenic rabbit line by artificial insemination using cryopreserved semen. *Lab Animal (NY)*, v.34, p. 61-63, 2005.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, v.25, p.383-391, 1973.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3^a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- EBERT, K.M.; SELGRATH, J.P.; DITULLIO, P., DENMAN, J.; SMITH, T.E.; MEMON, M.A.; SCHINDLER, J.E.; MONASTERSKY G.M.; VITALE, J.A.; GORDON, K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)*, v.9, p.835-838, 1991.
- FREITAS, V.J.F. Transgênese na espécie caprina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.109-115, 2003.
- FREITAS, V.J.F.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E.; DVORYANCHIKOV, G.A.; LOPES-JR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.; DIAS, L.P.B.; MOURA, R.R.; MELO, C.H.S.; MELO, L.M.; SOUSA, A.C.C.; SEROV, O.L.; PEREIRA, A.F.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; ALCÂNTARA-NETO, A.S.; ALBUQUERQUE, E.S.; RODRIGUES, V.H.V.; BATISTA, R.I.T.P. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*, v.105, p.105-113, 2012.
- GORDON, J.W.; SCANGOS D.J.; PLOTKIN, J.A.; BARBOSA J.A.; RUDDLE, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, v.77, p.7380-7384, 1980.

*Endereço para correspondência:
beatriz.mano@aluno.uece.br

HAMMER, R.E.; PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E. Jr.; 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, p.680-683, 1985

KEEFER, C.L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.5-12, 2004.

KRIMPENFORT, P.; RADEMAKERS, A.; EYESTONE, W.; VAN DER SCHANS, A.; VAN DEN BROEK, S.; KOOIMAN, P.; KOOTWIJK, E.; PLATENBURG, G.; PIEPER, F.; STRIJKER, R.; DE BOER, H. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology (NY)*, v.9, p.844-847, 1991.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.

MONTALDO, H.H. Genetic engineering applications in animal breeding. *Electronic Journal of Biotechnology*. v.92, p.157-170, 2006.

MONTOLIU, L.; LAVADO, A. Animais transgênicos na biologia, na biomedicina e na biotecnologia. In: COLLARES, T. Animais transgênicos: princípios e métodos. São Carlos: Suprema, p.114-136, 2005.

NIEMANN, H; KUES, W.A. Transgenic farm animals: an update. *Reproduction Fertility and Development*, v.19, p.762-770, 2007.

ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.; SÁNCHEZ-VALVERDE, M.A.; RUIZ, S.; VÁZQUEZ, J.M. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology*, v.38, p.115-125, 1992.

SMITH, C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*, v.10, p.9-16, 2003.

VELANDER, W.H.; JOHNSON, J.L.; PAGE, R.L.; RUSSELL, C.G.; SUBRAMANIAN, A.; WILKINS, T.D. High level expression of a heterologous in the milk of transgenic swine using the human cDNA encoding protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.83, p.12003-12007, 1992.

WALL, R.J.; KERR, D.E.; BONDIOLI, K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.2213-2224, 1997.

WHEELER, M.B. Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. *Journal of Animal Science*, v.81, p.32-37, 2003.

WRIGHT, G.; CARVER, A.; COTTOM, D.; REEVES, D.; SCOTT, A.; SIMONS, P. High level expression of active human a-1 antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Nature Bio/Technology*. v.9, p.830-834, 1991.