

EFEITOS DA ELETROPORAÇÃO CAPILAR PARA TRANSFEÇÃO DE RIBONUCLEOPROTEÍNA CAS9 EM ESPERMATOZÓIDES DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES²;
LEANDRO SILVA NUNES³; LUCAS PETITEMBERTE DE SOUZA⁴; IZANI BONEL
ACOSTA⁵; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁶

¹Universidade Federal de Pelotas– laisdsantosg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– williamwwe@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– leandrotsnunes@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas–lucasouza.contato@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas–izanibonel@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura refere-se ao cultivo de peixes em cativeiro. Apesar de antiga, a atividade está em constante expansão e aprimoramento. É esperado que até 2030 o setor tenha aumento significativo de mais de 33% na América Latina (FAO, 2018), e grande parte desse aumento é atribuída a países como o Brasil, onde a prática é privilegiada por grandes reservas de água doce e extensa área costeira.

Dentre as espécies cultivadas atualmente que contribuem com o papel de destaque do Brasil na piscicultura mundial está a tilápia-do-Nilo. Essa espécie apresenta adaptação a uma ampla gama de ambientes e possui diversas características favoráveis à piscicultura, como rusticidade, crescimento rápido, boa conversão alimentar e resistência a doenças (IFAM, 2016). Em 2023, a produção nacional atingiu um valor de 579.080 toneladas, representando 65.3% do volume total de peixes produzidos (PEIXE BR, 2024), conferindo ao Brasil o lugar de quarto maior produtor mundial de tilápia.

Apesar do papel de destaque nesse setor produtivo, o Brasil possui apenas 3% de participação nas exportações de tilápia (PEIXE BR, 2024). Dentre os obstáculos para melhorar a tilapicultura nacional, destacam-se as colorações escurecidas da maioria das variedades comerciais que prejudicam sua aparência e, conseqüentemente, diminuem o valor comercial da carne. Embora a seleção fenotípica de tilápias com menos manchas seja possível, é um processo laborioso, demorado e instável ao longo das gerações.

As tecnologias de edição genômica possibilitam uma alternativa para a seleção fenotípica de coloração, destacando-se a metodologia de CRISPR-Cas9. O sistema CRISPR (do inglês, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*), é um complexo formado por um RNA guia associado a uma enzima endonuclease (Cas9), capaz de reconhecer e clivar sequências alvo de DNA, complementares à sequência do RNA guia, através da quebra na dupla fita.

Visando um aumento na eficiência do processo de edição genômica, o complexo CRISPR vem sendo associado a diversas técnicas de transfeção celular, como a eletroporação, uma das abordagens comercialmente mais populares devido a sua simplicidade e alta eficiência. A eletroporação, como o nome sugere, utiliza pequenas descargas elétricas para abrir poros transientes nas membranas das células, permitindo a entrada de moléculas no interior da célula.

Assim, para aliar a precisão de edição genômica conferida pelo CRISPR com a eficiência de “entrega” de moléculas permitida pela eletroporação, torna-se interessante a utilização de espermatozoides, os quais possuem capacidade de

se ligarem espontaneamente ao DNA, ou material exógeno e transportá-lo para um oócito durante a fertilização (LAVITRANO et al, 1992), tornando possível que o espermatozoide atue como vetor de transferência gênica.

Apesar de suas vantagens, a técnica de eletroporação em espermatozoides pode apresentar efeitos negativos sobre parâmetros fundamentais para a sua funcionalidade, como a motilidade e viabilidade, o que pode vir a inviabilizar a posterior utilização destas células no processo de fertilização. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma técnica de eletroporação capilar associada a CRISPR-Cas9 em espermatozoides de tilápia-do-Nilo.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais e Coleta de Sêmen

Os peixes utilizados neste estudo foram obtidos de um criador comercial e criados no Laboratório de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro (UFPEL). Um total de 63 peixes machos adultos foram mantidos em um sistema de cultivo fechado contendo água desclorada, sem nitrito e aerada a 28 ± 2 °C, pH 7,0, sob fotoperíodo de 12 h de luz. Para coleta de sêmen, retirou-se o peixe da água e secou-se a região abdominal com auxílio de papel toalha, a fim de evitar o contato com a água. Em um primeiro momento o abdômen foi massageado, na região intestinal, no sentido crânio-caudal para remoção de urina e fezes. Após a secagem do local, outra massagem no sentido crânio-caudal foi realizada na região abdominal. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA) sob o número 23110.004940/2024-10.

2.2. Confecção de RNP CRISPR-Cas9 e Eletroporação

O desenho do RNA guia (sgRNA) foi realizado conforme descrito anteriormente por Hadar-Segev e colaboradores (2021) e adquirido da empresa GenScript. A nuclease Cas9-eGFP foi produzida também pela GenScript. O complexo RNP, composto pela nuclease Cas9-eGFP e o sgRNA específico foi montado seguindo as instruções do fabricante. A eletroporação foi realizada utilizando espermatozoides diluídos em solução isotônica BTS (Solução de Descongelamento de Beltsville) em um volume final de 10 μ L, misturados com o complexo RNP e depositados em uma ponta de pipeta. A eletroporação capilar foi conduzida usando o Sistema de Transfecção Neon[®] (Invitrogen, EUA). Os espermatozoides não eletroporados, sendo submetidos apenas a uma incubação simples com ou sem o complexo RNP, foram utilizados como controles.

2.3. Análise da Motilidade e Cinética Espermática

Após o procedimento de eletroporação, os espermatozoides foram avaliados por Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA, Minitube, Alemanha) para determinar os parâmetros cinemáticos. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA e teste de Tukey. A significância foi definida como $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise computadorizada da motilidade espermática observou-se que a motilidade total diminuiu com o aumento da intensidade do campo elétrico (Fig.1A). O mesmo padrão foi identificado para motilidade progressiva que diminuiu ($P < 0,05$) na maioria dos grupos eletroporados em relação ao controle (sêmen fresco não eletroporado), exceto no grupo 1 sem

RNP-eGFP, que registrou uma motilidade progressiva de 49,74% ± 1,68, como mostrado na Fig. 1B.

Além disso, a maioria dos grupos eletroporados com RNP-eGFP apresentou níveis de motilidade progressiva iguais ou superiores aos grupos homólogos, exceto o grupo 1 e o grupo controle incubado, que registraram motilidade progressiva de 24,5% ± 1,78 e 21,36% ± 1,0, respectivamente.

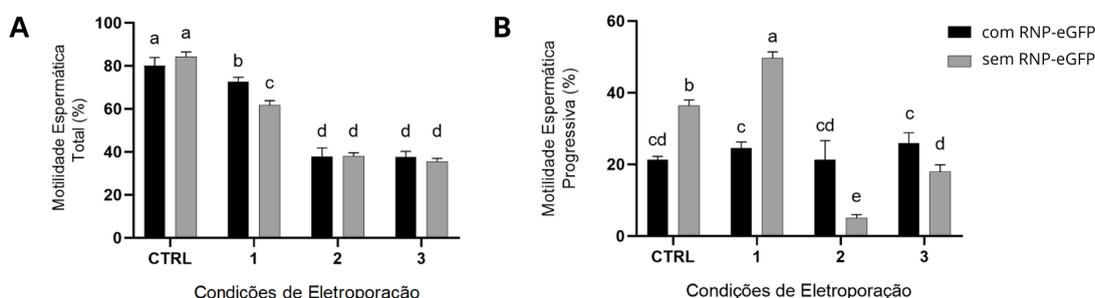


Figura 1. Motilidade total (A) e progressiva (B) de espermatozoides de tilápia eletroporados com RNP-eGFP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ao nível de $P < 0,05$. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média.

Os resultados apresentados demonstram uma relação inversamente proporcional entre a aplicação de pulsos elétricos e a motilidade espermática. À medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, observa-se uma redução significativa na motilidade dos espermatozoides, indicando que a força do pulso elétrico exerce um impacto direto sobre esse parâmetro. Ademais, a maioria dos grupos eletroporados com RNP-eGFP exibiram parâmetros de motilidade similares aos grupos homólogos (controle) sugerindo que a presença do RNP não interferiu de forma significativa na motilidade dos espermatozoides.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a técnica de eletroporação capilar teve efeitos deletérios sobre a motilidade espermática. À medida que campos elétricos mais fortes foram aplicados, a motilidade espermática diminuiu significativamente, ainda que tenha permanecido em níveis elevados em alguns grupos. Ademais, observou-se que a internalização do complexo RNP possivelmente conferiu um caráter protetivo aos espermatozoides, cujos parâmetros de motilidade total apresentaram semelhança ou superioridade ao grupo controle. Análises dos parâmetros morfofuncionais dos espermatozoides eletroporados nas diferentes voltagens estão sendo executadas, além da avaliação da taxa de internalização do complexo RNP por estes mesmos espermatozoides.

Como perspectiva, o presente trabalho propiciará o desenvolvimento de uma metodologia de entrega de ribonucleoproteína Cas9 em ovos de tilápias utilizando os espermatozoides como vetores funcionais. Dessa forma, será possível a geração de linhagens de tilápias editadas com características genéticas superiores, tais como maior ganho de peso ou maior tolerância a baixas temperaturas, impulsionando o setor de tilapicultura e consequentemente a economia nacional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira da Piscicultura. PEIXE BR, 2024. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/>. Acesso em 20 setembro, 2024

Fang, Wenyu et al. Identification of pigment genes (melanin, carotenoid and pteridine) associated with skin color variant in red tilapia using transcriptome analysis. **Aquaculture**, v. 547, p. 737429, 2022.

Fracasso, Nádia Carolina de Aguiar. **Diversidade do gene SLC45A2 na população urbana brasileira**: associações entre SNPs e fenótipos da pigmentação. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. doi:10.11606/D.17.2019.tde-08042019-164618.

Konoval, O., Korol, P., Tabaka, P., Kostenko, S., Lizhi, L., Chepiha, A., Doroshenko, M., Drahulian, M., Xingchen, B., Xuetao, H., Liუმeng, L., 2019. Generation of transgenic ducks by crispr/CAS9-mediated gene inser-tion combined with the sperm-mediated gene transfer (SMGT). **Biopolym. Cell** 35 (6), 427–436. <https://doi.org/10.7124/bc.000A16>.

Jeong, Chang-Bum et al. Generation of albino via SLC45a2 gene targeting by CRISPR/Cas9 in the marine medaka *Oryzias melastigma*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 154, p. 111038, 2020.

Laustsen, A.; Bak, R. O. Electroporation-Based CRISPR/Cas9 Gene Editing Using Cas9 Protein and Chemically Modified SgRNAs. In CRISPR Gene Editing; Luo, Y., Ed.; **Methods in Molecular Biology**; Springer New York: New York, NY, 2019; Vol. 1961, pp 127–134. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_9.

Lavitrano M, French D, Zani M et al (1992) The interaction between exogenous DNA and sperm cells. **Mol Reprod Dev** 31:161–169. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310302>

Moreno-Mateos, Miguel A. et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. **Nature methods**, v. 12, n. 10, p. 982-988, 2015.

Produção de tilápia: vantagens e aspectos legais. Universidade Online de Viçosa. <https://www.uov.com.br/cursos-online-piscicultura/artigos/www.uov.com.br/cursos-onlinepiscicultura/artigos/producao-de-tilapia-vantagens-e-aspectos-legais>. Acesso em 20 setembro, 2024.