

## **ELETROPORAÇÃO CAPILAR COMO FERRAMENTA PARA MELHORIA DA TRANSFERÊNCIA GÊNICA MEDIADA POR ESPERMATOZOIDE EM EQUINOS**

ISABELLA TEIXEIRA ESLABÃO<sup>1</sup>, DIONET KENY BELLIDO QUISPE<sup>2</sup>, WILLIAM BORGES DOMINGUES<sup>3</sup>, VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>4</sup>, MARIANA HÄRTER REMIÃO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [isabellateixeiraeslabao@gmail.com](mailto:isabellateixeiraeslabao@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [dionet0216@gmail.com](mailto:dionet0216@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [williamwwe@yahoo.com.br](mailto:williamwwe@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fariascampos@gmail.com](mailto:fariascampos@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mh.remiao@gmail.com](mailto:mh.remiao@gmail.com)

### **1.INTRODUÇÃO**

A transgênese animal consiste na inserção de DNA exógeno no genoma, permitindo sua transmissão às gerações seguintes (HOUDEBINE, 2003). Na produção animal, essa biotecnologia é explorada para aprimorar características como desempenho reprodutivo, eficiência alimentar, crescimento, resistência a patógenos e qualidade de produtos (SHAKWEER et al., 2023).

Entre as metodologias, destaca-se a Transferência Gênica Mediada por Espermatozoides (SMGT), técnica de baixo custo que utiliza a capacidade dos espermatozoides de internalizar DNA exógeno e transferi-lo durante a fertilização (LAVITRANO et al., 1989). O sucesso do SMGT depende tanto da eficiência de internalização quanto da preservação da funcionalidade espermática, motivando o desenvolvimento de estratégias para otimizar o processo (CAMPOS et al., 2011).

A eletroporação espermática, baseada na formação transitória de poros de membrana por pulsos elétricos, é uma dessas alternativas. Embora a eletroporação em cubeta seja simples e permita processar grandes volumes, a necessidade de altas voltagens compromete a viabilidade celular e aumenta a variabilidade de transfecção. Nesse cenário, a eletroporação capilar surge como alternativa promissora, pois gera campo elétrico mais uniforme, reduzindo danos celulares e melhorando a eficiência de transfecção em diferentes espécies (BLÖDORN et al., 2018). No entanto, seus efeitos sobre a qualidade espermática em equinos permanecem pouco elucidados. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto de diferentes voltagens de eletroporação capilar sobre a motilidade espermática em equinos.

### **2.METODOLOGIA**

#### **2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Amostras de sêmen equino foram fornecidas pela empresa Hartwig Fertilidade Equina (RS, Brasil), diluídas 1:1 em diluente comercial BotuSêmen® (Botupharma, Brasil) e transportadas até o Laboratório de Genômica Estrutural da UFPEL. No laboratório, apenas ejaculados com motilidade superior a 80% foram selecionados. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. As amostras elegíveis foram reunidas em um *pool*

homogêneo, lavadas por centrifugação a 700×g por 5 min para serem utilizadas nos processos e avaliações subsequentes.

## **2.2 ELETROPORAÇÃO CAPILAR**

Foram estabelecidos grupos experimentais variando quanto à presença de DNA exógeno (plasmídeo pEGFP-N1) e à submissão ao processo de eletroporação capilar. Os grupos eletroporados foram submetidos a diferentes voltagens (500, 1000, 1500, 2000 e 2500 V). Para cada tratamento, foram preparados 100 µL de suspensão contendo  $25 \times 10^6$  espermatozoides em meio Opti-MEM™ (Life Technologies, EUA). O DNA exógeno foi adicionado na concentração de 1 µg por 100 µL de amostra. A eletroporação foi realizada no equipamento Neon® (Invitrogen, EUA), aplicando-se um único pulso elétrico de 1 ms de duração em todas as voltagens testadas.

## **2.3 ANÁLISE DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA**

A motilidade foi avaliada por análise automatizada utilizando o sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis – AndroVision®, Minitube, Alemanha), acoplado a microscópio de contraste de fase (Olympus BX53) com aumento de 200×. Alíquotas de 5 µL das amostras foram depositadas em lâmina pré-aquecida a 37 °C e cobertas com laminula. Para cada amostra, de três a cinco campos foram examinados, sendo avaliados pelo menos 200 espermatozoides por campo para medição da motilidade total (%), definida como o percentual de espermatozoides com qualquer movimento flagelar.

## **2.4 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO ACROSSOMA**

A integridade acrossomal foi avaliada por coloração com lectina de amendoim (PNA) conjugada à fluoresceína isotiocianato (FITC) e iodeto de propídio (PI). Os espermatozoides foram classificados como com acrossomas íntegros (FITC/PNA– e PI–) ou como danificados (FITC/PNA+ e PI–; FITC/PNA– e PI+; FITC/PNA+ e PI+). Os resultados foram expressos como porcentagem de células com acrossomas intactos.

## **2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados de motilidade total e integridade acrossomal foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro–Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Atendidos esses pressupostos, aplicou-se two-way ANOVA para analisar os efeitos da presença de DNA exógeno e das diferentes voltagens de eletroporação. As comparações múltiplas entre grupos foram realizadas pelo teste de Tukey. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram conduzidas no GraphPad Prism v8.0. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (SEM), adotando-se significância em  $p < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A eletroporação capilar afetou os parâmetros de motilidade total e integridade do acrossoma. Conforme ilustrado na Figura 1, observou-se redução inversamente proporcional da motilidade total em relação ao aumento da voltagem, com diferenças significativas em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ), resultado



consistente com estudos prévios em outras espécies (BLÖDORN et al., 2018). Ainda, na presença de DNA exógeno, verificou-se queda acentuada da motilidade total somente nas maiores voltagens (2000 e 2500V), sugerindo efeito sinérgico entre estresse elétrico e plasmidial nestes grupos.

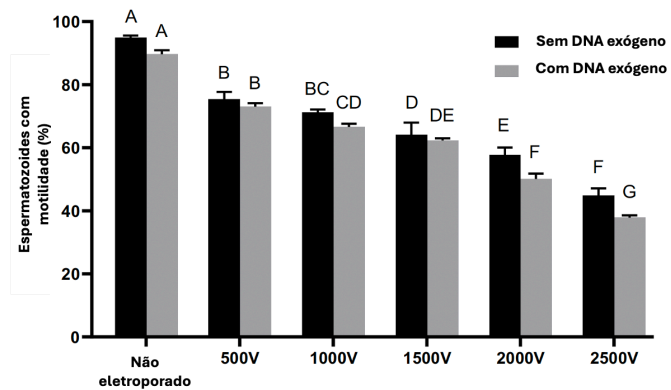


Figura 1 - Motilidade total dos espermatozoides submetidos a diferentes voltagens, na presença ou ausência de DNA exógeno, em sistema de eletroporação capilar na presença ou ausência de DNA exógeno. Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ao nível de  $p < 0,05$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.

Em relação à morfofuncionalidade espermática, a integridade do acrossoma não foi afetada nas voltagens até 1000V, onde os valores destes grupos (500 e 1000V) não mostraram diferenças em relação ao controle ( $p > 0,05$ ).

Grupos experimentais	DNA exógeno	Integridade do acrossoma
Não eletroporado	-	64.65 $\pm$ 1.41 <sup>A</sup>
	+	65.20 $\pm$ 2.67 <sup>A</sup>
500 V	-	59.26 $\pm$ 0.17 <sup>AB</sup>
	+	59.59 $\pm$ 0.32 <sup>ABC</sup>
1000 V	-	56.69 $\pm$ 2.28 <sup>ABC</sup>
	+	55.37 $\pm$ 1.17 <sup>ABC</sup>
1500 V	-	48.03 $\pm$ 1.33 <sup>BCD</sup>
	+	47.17 $\pm$ 4.08 <sup>CD</sup>
2000 V	-	41.00 $\pm$ 2.36 <sup>D</sup>
	+	40.43 $\pm$ 3.9 <sup>D</sup>
2500 V	-	37.65 $\pm$ 0.7 <sup>D</sup>
	+	36.40 $\pm$ 0.5 <sup>D</sup>

Tabela 1 - Integridade do acrossoma dos espermatozoides submetidos a diferentes voltagens, na presença ou ausência de DNA exógeno, em sistema de eletroporação capilar na presença ou ausência de DNA exógeno. Letras diferentes entre os grupos indicam diferença significativa ao nível de  $p < 0,05$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.

Semelhante à motilidade, a integridade acrossômica influencia a capacidade de fecundação durante a fertilização *in vitro*. Essa característica é essencial para

que o espermatozoide possa atravessar as células do cumulus que rodeiam o oócito e a zona pelúcida. Nossos resultados mostraram um padrão, onde, quanto maior a voltagem, maiores foram as perdas na integridade do acrossomo.

#### 4. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a eletroporação capilar exerce efeitos diferenciados sobre a motilidade total e a integridade acrossomal de espermatozoides equinos. Voltagens elevadas reduziram significativamente esses parâmetros, evidenciando a sensibilidade celular ao estímulo elétrico. Em contrapartida, voltagens intermediárias mostraram-se promissoras, permitindo a internalização de DNA sem comprometer de forma crítica a funcionalidade espermática necessária à fertilização. Esses resultados indicam que a aplicação de voltagens moderadas pode integrar protocolos de SMGT em equinos, contribuindo para superar limitações da metodologia convencional e favorecer a produção de animais geneticamente modificados. Entretanto, a otimização da técnica requer investigação adicional sobre variáveis críticas, incluindo intensidade dos pulsos elétricos, propriedades do DNA exógeno, condições do sêmen e composição do meio de eletrotransfecção.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BLÖDORN, E. B.; DOMINGUES, W. B.; KOMNINOU, E. R.; DANELUZ, L.; et al. Voltages up to 600V did not affect cryopreserved bovine spermatozoa on capillary-type electroporation. **Reproductive Biology**, Amsterdam, v.18, n.4, p.416-421, 2018.
- 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**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 717–723, June 2 1989.
- CAMPOS, V. F.; DESCHAMPS, J. C.; LAMY, C. E.; SEIXAS, F. K.; DORNELLES, R. C.; RIBEIRO, R. P.; SILVA, J. G. Internalization of exogenous DNA by Rhamdia quelen spermatozoa after seminal plasma removal. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v.37, n.3, p.579-586, 2011.
- HOUDEBINE, L. M. **Animal transgenesis and cloning**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. 248p.
- SHAKWEER, W. M. E.; KRIVORUCHKO, A. Y.; DESSOUKI, Sh. M.; KHATTAB, A. A. A review of transgenic animal techniques and their applications. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**, Cairo, v.21, p.55, 2023. doi: 10.1186/s43141-023-00502-z.