

PARÂMETROS PARA ELETROPORAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO* PARA INTRODUÇÃO CITOPLASMÁTICA DE TREALOSE

Pereira, J.L.¹, Paes de Carvalho, C.S.², Daher, R.F.³, Dias, A.J.B.⁴

¹UENF Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, janainahleite@yahoo.com.br

²UENF Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, carla@uenf.br

³UENF Laboratório de Engenharia Agrícola, rogdaher@uenf.br

⁴UENF Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético, aburla@uenf.br

Resumo - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eletroporação como ferramenta para introdução citoplasmática da trealose em ovócitos bovinos, visando sua utilização como crioprotetor intracelular. Inicialmente foram testados dois sistemas para a eletroporação (placa e cubeta) a fim de comparar a eficiência e praticidade de cada um deles. Em seguida foi avaliado o efeito da eletroporação utilizando 20 e 40 V, em meio com trealose. Posteriormente foi comparada a eletroporação com 40 e 130 V. A integridade da membrana plasmática após a eletroporação foi avaliada pela marcação com iodeto de propídio. Melhores resultados foram obtidos com a placa de eletroporação. No segundo experimento, a eletroporação com 40 V permitiu melhor permeabilização dos ovócitos que a de 20 V (86 e 60%, respectivamente). No último experimento, ovócitos eletroporados com 40 V e 130 V não apresentaram diferença significativa para reestruturação da membrana plasmática. A utilização da placa se mostrou de maior praticidade que a cubeta e a utilização de parâmetros com 40 V, pode ser mais adequada que com 130 V, para introdução citoplasmática da trealose, por impor os ovócitos a condições de menor estresse.

Palavras-chave: criopreservação, poros transitórios, membranas.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

A criopreservação de ovócitos bovinos é uma biotécnica importante para a produção *in vitro* de embriões e técnicas afins, porém os resultados obtidos são muito baixos (CHEN *et al.*, 2003; HASTENREITER *et al.*, 2006).

Recentemente a trealose vem sendo utilizada como crioprotetor extracelular para diversos tipos celulares. Porém, como as membranas celulares são impermeáveis a esse dissacarídeo de glicose, torna-se necessário desenvolver alternativas para sua introdução citoplasmática, visando potencializar sua ação.

A eletroporação permite a abertura de poros transitórios na membrana plasmática pela passagem de pulsos elétricos. Nesse processo vários ovócitos podem ser trabalhados ao mesmo tempo.

A intensidade do campo elétrico, medido em kV/cm é um dos parâmetros decisivos na indução da permeabilização da membrana e controla a extensão da superfície celular afetada pelo pulso elétrico, enquanto que o número de pulsos elétricos controla a taxa de permeabilização da membrana (ROLS *et al.*, 1998). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar dois tipos de

recipientes e diferentes parâmetros para eletroporação de ovócitos bovinos, utilizando a trealose como crioprotetor.

Metodologia

Os ovários foram obtidos em matadouros da região de Campos dos Goytacazes.

Os folículos com diâmetro de 2–6 mm foram aspirados e após 10 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 3-5 mL de meio de manipulação [meio-199 com sais de Earle, acrescido de 25 mM de Hepes e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)]. Somente ovócitos contendo três ou mais camadas de células do *cumulus oophorus* e citoplasma uniforme foram utilizados para os experimentos.

Os complexos *cumulus oophorus* selecionados foram transferidos para o meio de maturação [meio-199 com sais de Earle, acrescido de 20 mM de bicarbonato de sódio, 5,0 µg/mL de LH, 0,5 µg/mL de FSH e antibióticos) e mantidos em gotas de 100 µL (20-25 ovócitos por gota), sob óleo mineral, por um período de 22 horas, a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂.

Os ovócitos foram transferidos para o meio de desnudamento (0,01 mg/mL de PVA em 10 mL de PBS), e as células do *cumulus oophorus* foram retiradas mecanicamente com o auxílio de um micropipetador.

No primeiro experimento foi avaliado o efeito da eletroporação realizada em placa (modelo 450, BTX) ou em cubeta (modelo 620, BTX), sobre o grau de permeabilização e a integridade dos ovócitos. Os pulsos elétricos foram controlados pelo eletroporador (ECM 2001, BTX), utilizando 130 V e 5 pulsos de 60 µs cada, como parâmetros para eletroporação.

Para a eletroporação em placa os ovócitos foram colocados em 20 µL da solução de

eletroporação (sulfato de magnésio 0,1 mM; trealose 150 mM e manitol 140 mM), e na cubeta em 400 µL da mesma solução.

Após a eletroporação os ovócitos foram incubados numa solução de iodeto de propídio (IP) (10 µg/mL, em PBS), a fim de verificar a abertura de poros transitórios da membrana, pela eletroporação. O iodeto de propídio é um marcador fluorescente que tem afinidade por ácidos nucleicos e que não atravessa membranas intactas. A marcação foi feita aos 5 e 30 minutos após a eletroporação, visto que aos cinco minutos as células deveriam apresentar poros na membrana e aos 30 minutos os poros deveriam já se encontrar fechados novamente. Os ovócitos foram avaliados com auxílio de um microscópio de fluorescência (TE 300, Nikon), sob aumento de 40x.

No segundo experimento foi realizada a comparação de diferentes voltagens para a eletroporação de ovócitos bovinos, ambos utilizando a placa de eletroporação (modelo 450, BTX) juntamente com 20 µL de solução trabalho (sulfato de magnésio 0,1 mM; trealose 150 mM e manitol 140 mM). Ovócitos foram eletroporados com 4 pulsos de 2 µs de duração cada, de 20 V (T1) ou 40 V (T2). No terceiro experimento foram comparados diferentes parâmetros de eletroporação [T2 (4 pulsos de 2 µs de duração cada, de 40 V) e T3 (130 V e 5 pulsos de 60 µs)].

Resultados

No primeiro experimento foi comparada a utilização de placa ou cubeta para a eletroporação. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias feita pelo teste t-Student's, com $\alpha = 0,05$. Os resultados encontram-se especificados na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 1: Valores médios de células lesadas e desvio padrão de ovócitos bovinos marcados pelo iodeto de propídio aos 5 e 30 minutos após a eletroporação em placa e cubeta.

Tratamentos	n	(%±DP)	
		5 min	30 min
Placa	40	80 ± 1,8	10 ± 0,5
Cubeta	40	70 ± 1,0	15 ± 0,8

No segundo experimento, as voltagens testadas (20 e 40 V) para a eletroporação apresentaram diferença significativa no percentual de ovócitos marcados pelo IP (60 e 86%, respectivamente). Os dados foram analisados por meio de intervalo de confiança para proporção com auxílio do programa computacional SAEG, versão 9.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001), considerando o nível de significância α igual a 5%.

A utilização de diferentes parâmetros de eletroporação (T2 e T3) de ovócitos bovinos resultou em diferença significativa no percentual de ovócitos marcados pelo IP, aos 5 minutos após a eletroporação (75 e 100%, respectivamente), enquanto que aos 30 minutos os tratamentos não apresentaram resultados significativamente diferentes (15 e 35%, respectivamente) (Figura 1). A análise dos dados foi realizada conforme descrito para o segundo experimento.

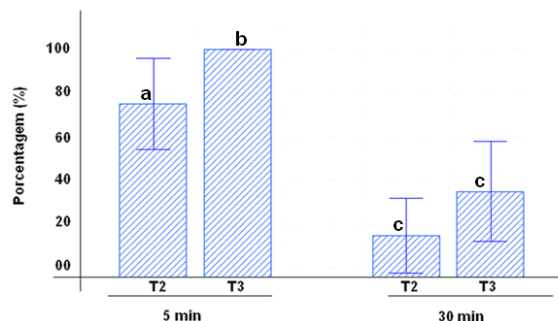


Figura 1: Percentagem de ovócitos marcados pelo IP, após 5 e 30 minutos da eletroporação, com diferentes parâmetros (T2 e T3).

Discussão

A eletroporação tem sido utilizada para transferência de genes e diversos tipos de moléculas extracelulares (TEISSIE et al, 2005; CHEN et al, 2006), porém são escassas as informações sobre seu uso para ovócitos bovinos. Além disso os resultados podem variar grandemente, quando da variação de algum dos diferentes parâmetros utilizados (duração do pulso, voltagem, soluções, recipientes).

A comparação da eletroporação de ovócitos bovinos em placa ou em cubeta teve por objetivo determinar uma metodologia de maior eficiência e praticidade. Constatou-se que não houve diferença significativa entre os dois recipientes, porém foi verificado que a placa apresenta maior facilidade de trabalho, pois permite a observação dos ovócitos durante todo o procedimento, o que concorre para evitar a perda de ovócitos, como verificado no uso da cubeta. Dessa forma foi decidido continuar os demais experimentos utilizando a placa de eletroporação.

Sendo a voltagem um dos parâmetros que interfere fortemente no grau de permeabilização da membrana plasmática e na integridade celular (ROLS et al, 1998), foi desenvolvido um experimento visando determinar o efeito da voltagem sobre a

permeabilidade da membrana plasmática. Para isso os ovócitos foram submetidos a tratamentos onde variou-se apenas a voltagem (20 e 40 V), analisando-se o percentual de ovócitos marcados pelo IP após 5 minutos da eletroporação. A maior voltagem (40 V) permitiu maior percentual de ovócitos marcados, enquanto que a eletroporação com 20 V permitiu a marcação de apenas 60% dos ovócitos eletroporados, valor inferior ao obtido no primeiro experimento, quando se utilizou uma voltagem mais elevada (130 V).

Dessa forma, foi realizada a comparação de parâmetros utilizados em experimentos anteriores. Os ovócitos foram submetidos a eletroporação seguindo os parâmetros utilizados em T2 e T3. Os resultados apresentados indicam uma maior taxa de permeabilização da membrana plasmática promovida pelo Tratamento 3. Porém torna-se necessário avaliar a viabilidade dos ovócitos em decorrência da elevada voltagem utilizada no referido tratamento (130 V).

Conclusão

A utilização da placa se mostrou de maior praticidade que a cubeta e a utilização de parâmetros com 130 V resultou em maior permeabilização da membrana plasmática. No entanto testes de viabilidade celular deverão ser realizados para definir o impacto dos tratamentos sobre o potencial de desenvolvimento dos ovócitos bovinos.

Referências

CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHAO, K.H.; Ho, H.N.; Yang, Y.S.; Lee, T.Y. Effect of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocytes freezing a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 202, p. 101-107, 2003.

EROGLU, A.; LAWITTS, J.A.; TORNER M.; TOTH, T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility*, v. 77, p. 152-158, 2002.

HASTENREITER, G.P.; DIAS, A.J.B.; MATOS, L.F.; CARVALHO, C.S.P.; GEBER, S. (2008) Uso da trealose intracelular na vitrificação de ovócitos bovinos maturados. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* v.12, n. 1, p. 32-39, 2008.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. *Análises estatísticas no SAEG*. Viçosa: Editora UFV, 2001. 301 p.