

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

JOÃO VICTOR CARVALHO DO COUTO REIS

**EFEITO DA VOLTAGEM DE ELETROPORAÇÃO DE ZIGOTOS
BOVINOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA
PERMEABILIDADE DE MEMBRANA**

Campos dos Goytacazes-RJ

2025

JOÃO VICTOR CARVALHO DO COUTO REIS

**EFEITO DA VOLTAGEM DE ELETROPORAÇÃO DE ZIGOTOS BOVINOS NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA**

**Dissertação apresentada ao Centro
de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Luis Fonseca Matos

Coorientador: Prof. Dr. Angelo José Burla Dias

Campos dos Goytacazes

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

R375

Reis, João Victor Carvalho do Couto.

EFEITO DA VOLTAGEM DE ELETROPORAÇÃO DE ZIGOTOS BOVINOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA / João Victor Carvalho do Couto Reis. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

38 f. : il.

Bibliografia: 34 - 38.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2025.

Orientador: Luis Fonseca Matos.

Coorientador: Angelo Jose Burla Dias.

1. Blastocisto. 2. Desenvolvimento embrionário. 3. Edição gênica. 4. Permeabilização de membrana. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 124

JOÃO VICTOR CARVALHO DO COUTO REIS

EFEITO DA VOLTAGEM DE ELETROPORAÇÃO DE ZIGOTOS BOVINOS NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Aprovado dia 07 de outubro de 2025

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

LUIZ SERGIO DE ALMEIDA CAMARGO
Data: 20/02/2026 10:52:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo - EMBRAPA



Documento assinado digitalmente

WILDER HERNANDO ORTIZ VEGA
Data: 02/03/2026 16:09:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wilder Hernando Ortiz Vega – UENF



Documento assinado digitalmente

ALVARO FABRICIO LOPES RIOS
Data: 27/02/2026 17:46:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes – UENF



Documento assinado digitalmente

LUIS FONSECA MATOS
Data: 27/02/2026 15:00:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luis Fonseca Matos - UENF (Orientador)

Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento.

Provérbios 2:6

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Foi por Sua graça que cada etapa desta caminhada pôde ser concluída. À minha família, que me apoiou desde sempre, oferecendo todo o suporte para que eu pudesse realizar o sonho de ser Médico Veterinário. À minha mãe, Maria da Penha Couto Reis, pelo zelo e cuidado que me permitiram chegar até aqui. Ao meu pai, Victor Couto Reis, pela força e coragem, acreditando naquilo que eu poderia me tornar desde o momento em que realizou minha inscrição no vestibular. Ao meu irmão, Lucas Couto Reis, obrigado por ser parceiro e por dividir comigo praticamente os mesmos sentimentos de um filho, sorrindo e chorando, buscando juntos crescer. À minha amada noiva, Júlia Tardivo, pelo apoio incondicional, compreensão e por acreditar em cada detalhe dessa nova história que o Senhor tem escrito em minha vida.

Somos surpreendidos, ao longo da vida, por boas pessoas que são usadas por Deus para nos direcionar a novos caminhos. Quero deixar meus agradecimentos ao meu amigo Cainan Bueno, por ter me apresentado à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

De forma especial, agradeço ao professor e orientador Luís Fonseca, que confiou em mim e me concedeu a oportunidade de ingressar no mestrado, sendo fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também ao professor Angelo Burla, pela coorientação e por ter disponibilizado o laboratório para a realização dos experimentos.

Aos bons amigos e aos técnicos do laboratório LRMGA, que foram importantes para que eu pudesse realizar todas as etapas do experimento.

Por fim, agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) pela estrutura, pelo corpo docente qualificado, pelo apoio e pela oportunidade de obtenção do grau de mestre.

RESUMO

COUTO REIS, João Victor; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Outubro de 2025; Efeito da voltagem de eletroporação de zigotos bovinos no desenvolvimento embrionário e na permeabilidade de membrana. Orientador: Prof. Dr. Luis Fonseca Matos e Coorientador: Prof. Dr. Angelo José Burla Dias.

A eletroporação tem se consolidado como uma ferramenta relevante na introdução de moléculas exógenas em embriões, com aplicações crescentes em biotecnologias reprodutivas e de edição gênica. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das voltagens de eletroporação de zigotos bovinos no desenvolvimento embrionário e na permeabilidade de membrana. O procedimento foi conduzido no eletroporador ECM 830 (BTX), utilizando eletrodos de 1 mm e aplicando três pulsos de 3 ms, com intervalos de 50 ms, nas voltagens de 0, 10, 15 e 20 V/mm. O efeito das diferentes voltagens de eletroporação sobre as taxas de clivagem, formação de blastocistos e permeabilidade da membrana foi analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. Após três dias de cultivo *in vitro*, verificou-se que as taxas de clivagem não diferiram estatisticamente entre os grupos Controle, 10 V e 15 V, mas foram significativamente reduzidas em 20 V. Quanto à taxa de blastocisto, os grupos Controle e 10 V apresentaram os melhores resultados, enquanto 15 V e 20 V comprometeram o desenvolvimento embrionário. A permeabilidade foi avaliada pela incorporação de TMR-Dextran logo após a eletroporação, observando-se aumento progressivo dos valores de fluorescência total corrigida (CTCF) conforme a voltagem aplicada, exceto entre Controle e 10 V. De forma integrada, os resultados mostram que a intensidade do campo elétrico afeta simultaneamente a viabilidade e a permeabilidade dos zigotos bovinos. A voltagem de 10 V apresentou o melhor equilíbrio entre preservação do desenvolvimento embrionário e aumento da permeabilidade, enquanto 15 V e 20 V reduziram de forma significativa o potencial de desenvolvimento. Assim, conclui-se que a otimização dos parâmetros elétricos é essencial para a transfecção de grandes fragmentos de DNA, reforçando a eletroporação como abordagem viável em programas de manipulação embrionária.

Palavras-chave: Blastocisto; desenvolvimento embrionário; edição gênica; permeabilização de membrana.

ABSTRACT

COUTO REIS, João Victor; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Outubro de 2025; Effect of electroporation voltage on embryonic development and membrane permeability of bovine zygotes. Orientador: Prof. Dr. Luis Fonseca Matos e Coorientador: Prof. Dr. Angelo José Burla Dias.

Electroporation has become established as a relevant tool for the introduction of exogenous molecules into embryos, with increasing applications in reproductive biotechnology and gene editing. This study aimed to evaluate the effects of electroporation voltages applied to bovine zygotes on embryonic development and membrane permeability. The procedure was performed using an ECM 830 electroporator (BTX), with 1-mm electrodes and three 3-ms pulses applied at 50-ms intervals, at voltages of 0, 10, 15, and 20 V/mm. The effects of the different electroporation voltages on cleavage rates, blastocyst formation, and membrane permeability were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test, with a significance level of 5%. After three days of *in vitro* culture, cleavage rates did not differ statistically among the Control, 10 V, and 15 V groups but were significantly reduced at 20 V. Regarding blastocyst rates, the Control and 10 V groups showed the best results, whereas 15 V and 20 V impaired embryonic development. Membrane permeability was assessed by TMR-Dextran uptake immediately after electroporation, revealing a progressive increase in corrected total cell fluorescence (CTCF) values as the applied voltage increased, except between the Control and 10 V groups. Taken together, the results demonstrate that electric field intensity simultaneously affects both viability and permeability in bovine zygotes. The 10 V voltage provided the best balance between preservation of embryonic development and increased permeability, whereas 15 V and 20 V significantly reduced developmental potential. Therefore, optimization of electrical parameters is essential for the transfection of large DNA fragments, reinforcing electroporation as a viable approach in embryonic manipulation programs.

Keywords: Blastocyst; embryonic development; gene editing; membrane permeabilization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxas de clivagem e de formação de blastocisto de zigotos bovinos partenogênicos eletroporados com diferentes voltagens. As taxas de clivagem e blastocisto foram calculadas com base no número de zigotos cultivados. Sobrescritos diferentes indicam significância ao nível de 5%, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn. 28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Aplicações da eletroporação. Fonte: adaptado de Pereira et al. (2015). 16
- Figura 2: Fluxograma do experimento 1. 22
- Figura 3: Fluxograma do experimento 2. 23
- Figura 4: Microscopia em campo claro e de fluorescência de zigotos bovinos não eletroporados (0 V) ou com 3 pulsos de 10 V, 15 V ou 20 V na presença de Dextran-Rodamina (3.000 Da). 29
- Figura 5: Fluorescência total corrigida (CTCF) de zigotos bovinos partenogênético eletroporados com 10 V, 15 V e 20 V na presença de Dextran-Rodamin 3.000. 30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 ELETROPORAÇÃO	13
3.1.1 Histórico da eletroporação	13
3.1.2 Mecanismo de ação da eletroporação	14
3.1.3 Eletroporação de zigotos	16
3.2 TRANSGENIA	19
3.3 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
4.1.1 Experimento 1. Efeito da intensidade da voltagem de eletroporação no desenvolvimento de embriões bovinos partenogênicos	22
4.1.2 Experimento 2. Efeito da intensidade da voltagem de eletroporação na permeabilidade ao tetrametilrodamina (TMR) Dextran em zigotos bovinos	23
4.2. OBTENÇÃO DOS COCS	24
4.3. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OVÓCITOS BOVINOS	24
4.4 DESNUDAMENTO E ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS	24
4.5 ELETROPORAÇÃO	25
4.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	25
4.7 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE AO DEXTRAN-RODAMINA	26
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

A eletroporação de zigotos bovinos tem ganhado destaque na reprodução animal moderna como uma estratégia promissora para promover modificações genéticas, possibilitando o desenvolvimento de animais portadores de características de interesse produtivo, sanitário e biotecnológico. Esta técnica fornece métodos alternativos e mais eficientes do que a microinjeção tradicional para a introdução de material genético de interesse em embriões. Originalmente desenvolvida para facilitar a entrada de moléculas de DNA e RNA nas células, a eletroporação utiliza pulsos elétricos para permeabilizar temporariamente a membrana celular, permitindo que moléculas exógenas possam passar através dela.

A membrana plasmática, organizada como uma bicamada lipídica, funciona como barreira seletiva a íons e macromoléculas. Quando submetida a pulsos elétricos controlados, ocorre uma reorganização da estrutura lipídica e a formação de poros transitórios, processo amplamente descrito por Neumann et al. (1982) e aprimorado em aplicações embrionárias nas últimas décadas. A eficiência dessa permeabilização depende de parâmetros como intensidade do campo elétrico, tempo de pulso, número de pulsos e distância entre eletrodos — variáveis que influenciam diretamente o balanço entre viabilidade embrionária e permeabilidade. Estudos recentes demonstram que ajustes inadequados dessas variáveis podem causar danos irreversíveis aos zigotos, reduzindo as taxas de clivagem e desenvolvimento (NAMULA et al., 2019 e CAMARGO et al., 2020).

Diversos trabalhos têm avaliado a eletroporação em zigotos bovinos como método para entrega do sistema CRISPR/Cas9 utilizando RNA guia ou fragmentos de DNA. Miao et al. (2019) demonstraram que a técnica é capaz de promover edições gênicas eficientes em estágios iniciais, embora o sucesso esteja diretamente associado à permeabilização adequada. Contudo, um dos maiores desafios relatados pela literatura é a dificuldade de manter a viabilidade com entrega eficiente, cuja internalização requer campos elétricos suficientemente altos para permitir a entrada molecular, mas sem comprometer a integridade embrionária. A busca desse ponto de equilíbrio permanece uma lacuna importante, especialmente em bovinos, em que a sensibilidade dos zigotos ao estímulo elétrico pode variar conforme o modelo experimental adotado.

Outro aspecto fundamental é a diversidade de equipamentos utilizados nos protocolos de eletroporação. Sistemas como ECM 830 (BTX), NEPA21 (Nepa Gene) e CUY21 apresentam diferenças substanciais na forma de geração dos pulsos, controle da impedância, modos de onda e precisão na entrega da voltagem. Isso resulta em variabilidade nos resultados entre estudos, reforçando a necessidade de investigações sistemáticas que comparem ou padronizem parâmetros aplicáveis ao desenvolvimento embrionário bovino. Trabalhos como o de Du et al. (2025) demonstram que, mesmo sob protocolos semelhantes, pequenas variações nas configurações do equipamento podem alterar de forma significativa tanto a permeabilidade quanto a viabilidade dos zigotos.

Dessa forma, apesar dos avanços apresentados na literatura no que diz respeito ao uso da eletroporação para a edição gênica, a falta de protocolos que atinjam a otimização da exposição de embriões a fatores exógenos e ao mesmo tempo mantenham a competência para desenvolvimento embrionário, ainda é um dos principais problemas a serem resolvidos. Essa necessidade evidencia a carência de trabalhos que considerem de forma empírica a ação de diferentes voltagens e outros fatores elétricos, assim como seus eventuais efeitos sobre zigotos bovinos.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes voltagens de eletroporação de zigotos bovinos no desenvolvimento embrionário e na permeabilidade de membrana, analisando seus impactos nas taxas de clivagem, formação de blastocistos e permeabilidade ao marcador fluorescente TMR-Dextran.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes voltagens para abertura de poros em zigotos bovinos partenogénéticos, um protocolo de eletroporação de zigotos bovinos para avaliação do desenvolvimento embrionário e permeabilidade de membrana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da eletroporação de zigotos bovinos partenogénéticos com 10 V, 15 V e 20 V na taxa de clivagem e na taxa de formação de blastocistos bovinos.
2. Avaliar o efeito da eletroporação com 10 V, 15 V e 20 V na permeabilidade ao Dextran marcado com tetrametilrodamina (TMR-D) em zigotos bovinos partenogénéticos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ELETROPORAÇÃO

3.1.1 Histórico da eletroporação

A eletroporação surgiu inicialmente como um método inovador para promover a entrada de moléculas de DNA e RNA no interior das células. Essa técnica se fundamenta na aplicação de pulsos elétricos de curta duração, que nos permitem temporariamente abrir a membrana plasmática e, a partir disso, fazer a introdução de moléculas como DNA e RNA. Um marco importante nesse campo foi o trabalho de Neumann et al. (1982), que publicaram um dos primeiros estudos demonstrando a viabilidade da eletroporação em células de mamíferos, estabelecendo as bases para o desenvolvimento e a consolidação dessa abordagem nas pesquisas em biotecnologia celular e molecular.

Os primeiros experimentos com eletroporação foram realizados na década de 1980, configurando-se como uma alternativa promissora às metodologias tradicionais de introdução de material genético, como a microinjeção nuclear e o uso de vetores virais. Desde então, a técnica tem sido reconhecida como uma estratégia eficiente para a transformação celular. Evidências iniciais mostraram que pulsos elétricos acima de um limiar crítico induzem a formação de poros transitórios na membrana plasmática, permitindo a entrada de moléculas exógenas sem comprometer sua integridade estrutural (NEUMANN et al., 1982).

A eletroporação avançou significativamente com os primeiros êxitos ao aplicar essa técnica em células, o que foi crucial para lançar os fundamentos das suas múltiplas aplicações nas décadas posteriores. Os primeiros trabalhos de Neumann et al. (1982) foram importantes para a eletroporação. Os pesquisadores demonstraram que é possível induzir a captação de DNA em células de mamíferos através do pulso elétrico. A partir desse momento, a técnica tem se difundido de forma rápida, tendo sido aplicada em diversas áreas, como engenharia genética, terapia gênica e estudos celulares e moleculares (NEUMANN et al., 1982).

Na década de 1990, a eletroporação consolidou-se como uma ferramenta amplamente explorada em pesquisas biomédicas e aplicações clínicas. Nesse período, ocorreu um avanço notável quando Mir et al. (1999) descreveram, de forma pioneira, a transferência eficiente de genes em células humanas por meio dessa

técnica. Esse resultado evidenciou não apenas a eficácia da eletroporação para introduzir material genético em células complexas, mas também reforçou seu potencial como estratégia promissora para a terapia gênica, abrindo novas perspectivas para o tratamento de doenças hereditárias e adquiridas (MIR et al., 1999).

Os avanços obtidos com a eletroporação aplicada a zigotos impulsionaram o aperfeiçoamento da técnica e favoreceram o surgimento da chamada eletroporação *in vivo*, que possibilita a entrega direta de material genético a diferentes tecidos vivos, incluindo músculos, pele e até órgãos internos. Essa evolução representou um marco importante, pois ampliou consideravelmente as aplicações da técnica, estendendo seu uso para contextos terapêuticos. A partir dessa descoberta, abriram-se novas perspectivas para a terapia gênica e para a medicina regenerativa, áreas que se beneficiam da capacidade de introduzir genes de forma localizada e relativamente controlada em organismos complexos (HELLER e HELLER, 2006).

Além disso, com o objetivo de aumentar a eficiência e a especificidade na entrega de genes, a técnica de eletroporação tem sido integrada a estratégias complementares, tais como a utilização de nanopartículas para o transporte de material genético e substâncias de contraste. Esta integração amplia a capacidade de inserção de DNA ou RNA em células específicas e fornece um controle mais refinado do mecanismo de entrega gênica. Investigações científicas revelaram resultados encorajadores em diversos cenários médicos, abrangendo o manejo de patologias neurológicas, processos tumorais e enfermidades genéticas transmissíveis, consolidando a eletroporação como um recurso adaptável e significativo com valor terapêutico (GOLZIO et al., 2002).

3.1.2 Mecanismo de ação da eletroporação

Do ponto de vista físico e biológico, o processo de eletroporação consiste em várias fases distintas. Começa aplicando um pulso de voltagem específica à membrana por um determinado período, o que leva à migração de íons e ao subsequente acúmulo de cargas na bicamada lipídica. Ao atingir um limiar crítico, a membrana lipídica sofre um rearranjo morfológico, levando à formação de pré-poros e, posteriormente, dos próprios poros. Como resultado, a transição de um estado não

condutor para um estado condutor depende do reposicionamento da extremidade do poro (PEREIRA et al., 2015).

A eficiência do processo depende da intensidade do campo elétrico, da duração e do número de pulsos, além da condutividade do meio, que influencia tanto o aquecimento por efeito Joule quanto a estabilidade dos poros (PUCIHAR et al., 2001 e RUZGYS et al., 2019). Durante o pulso, os ácidos nucleicos carregados negativamente migram eletroforicamente em direção à membrana permeabilizada, o que facilita a entrada de DNA, RNA e proteínas no citoplasma (ROLS, 2006).

O processo de abertura de poros ocorre em um intervalo de tempo extremamente curto, da ordem de nanossegundos, sendo ainda mais rápido para campo mais alto aplicado. A utilização de campos elétricos muito acima do valor crítico pode causar uma permeabilização permanente da membrana celular. Estes poros que se formam após aplicação de um campo elétrico transmembrana têm dimensões adequadas para servirem como condutores para íons e moléculas (RAKOCZY et al., 2022).

Quando o pulso termina, os poros se fecham e a estrutura retorna ao seu estado original, se a eletroporação for reversível. Alternativamente, no caso de eletroporação irreversível, a membrana celular permanece permeável ou sofre expansão, resultando em última análise na ruptura da célula. A utilização destas aplicações está sujeita a um controle preciso dos parâmetros dos pulsos elétricos para funcionar de maneira ideal, como a intensidade, duração, amplitude ou frequência do pulso. Além disso, pode-se determinar o número de pulsos e sua distância mútua alterando esses valores (PEREIRA et., 2015).

A ilustração da Figura 1 mostra a resposta de uma célula colocada entre dois eletrodos e exposta a um pulso elétrico. Este método, conhecido como eletroporação, é multifuncional: pode ajudar na fusão celular, na introdução de diferentes moléculas (proteínas, íons, medicamentos, DNA e outras macromoléculas que não podem entrar facilmente na célula através da bicamada lipídica) e até provocar lesão da membrana celular.

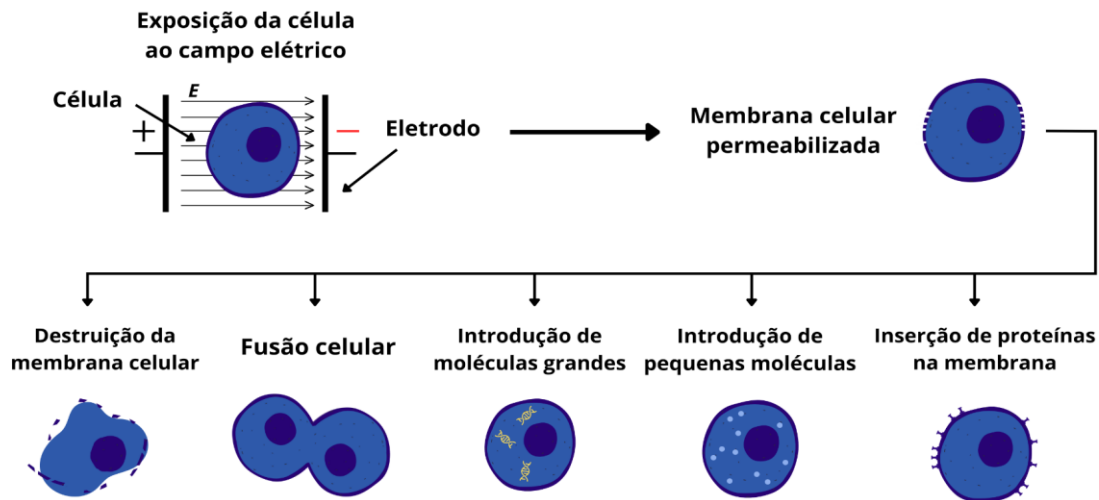


Figura 1: Aplicações da eletroporação. Fonte: adaptado de Pereira et al. (2015).

O sucesso da eletrotransferência genética depende de dois fatores: a eletropermeabilização eficaz da membrana celular e a manutenção da viabilidade celular. Esses aspectos são influenciados pela intensidade do campo elétrico, pelo número de pulsos e pela duração do tratamento. Vale ressaltar que a membrana plasmática é naturalmente impermeável a moléculas hidrofílicas, como ácidos nucleicos. Além disso, as moléculas de DNA têm dificuldade em alcançar o citoplasma devido às moléculas de plasmídeos carregadas negativamente, causando repulsão eletrostática pela membrana plasmática, que também é carregada negativamente (ROSAZZA et al., 2016).

3.1.3 Eletroporação de zigotos

A eletroporação destaca-se como uma técnica eficiente para a introdução de ribonucleoproteínas (RNPs) Cas9 associadas ao RNA de guia único (sgRNA) em zigotos, viabilizando a edição precisa do genoma. Esse método, além de apresentar elevada taxa de sucesso, com índices de entrega de RNPs próximos a cem por cento, é considerado relativamente simples e de menor custo quando comparado à microinjeção, que exige maior nível de habilidade técnica e equipamentos

especializados. Outra vantagem importante é a versatilidade da técnica, que permite tanto a inserção quanto a deleção de genes, ampliando seu potencial de aplicação em biotecnologias reprodutivas e em pesquisas de edição gênica (DIALLO e MODZELEWSKI, 2022).

Embora a eletroporação de zigotos bovinos seja uma alternativa promissora à microinjeção e à transferência nuclear, a literatura evidencia limitações importantes para sua aplicação plena na reprodução bovina. Estudos iniciais com o sistema GEEP demonstraram que a entrega direta da Cas9 por eletroporação é capaz de induzir mutações em zigotos, mas o ganho em eficiência de edição ocorre acompanhado de impacto variável sobre o desenvolvimento embrionário. Esses achados indicam uma estreita margem operacional entre a permeabilização adequada e a indução de lesões celulares excessivas (NAMULA et al., 2019).

Um estudo realizado por Namula et al. (2019) em embriões bovinos para o gene da miostatina (MSTN) demonstrou que o aumento da voltagem para 20 V para eletroporar zigotos 10h após fertilização *in vitro* (FIV) reduziu as taxas de blastocistos, em relação aos zigotos eletroporados com 10 V. No entanto, a taxa de mutação nos blastocistos foi significativamente maior em zigotos eletroporados com 20 V às 10h após fertilização *in vitro* (FIV), quando comparado aos zigotos eletroporados às 15h após fertilização *in vitro* (FIV).

Um dos desafios centrais está na relação entre parâmetros elétricos e viabilidade embrionária. Camargo et al. (2020) otimizaram a eletroporação de RNPs Cas9:sgRNA em zigotos bovinos zona-intactos e observaram que o aumento da voltagem intensifica a permeabilidade da membrana; entretanto, valores acima de aproximadamente 15 V/mm reduzem significativamente as taxas de clivagem e formação de blastocistos, demonstrando um efeito dose-dependente dos pulsos elétricos sobre a competência de desenvolvimento (CAMARGO et al., 2020).

Resultados semelhantes têm sido relatados em outras espécies. Em búfalos, Punetha et al. (2024) padronizaram um protocolo de edição gênica em zigotos produzidos *in vitro* e demonstraram que a condição de 20 V, 5 pulsos de 3 ms elevou de forma expressiva a eficiência de knockout, atingindo 84% de mutação, com predominância de mutações bialélicas e redução do mosaicismo, sem comprometer as taxas de clivagem e formação de blastocistos, que permaneceram semelhantes às do grupo controle. A deleção de POU5F1 não prejudicou o desenvolvimento inicial,

mas modulou a expressão de SOX2, NANOG e GATA2, reforçando o papel central desse gene na manutenção da pluripotência e evidenciando o potencial do protocolo otimizado para investigações em genômica funcional.

Outra limitação recorrente é o mosaicismos pós-edição, processo fortemente influenciado pelo momento em que o zigoto é exposto ao sistema CRISPR/Cas9. Nesse contexto, Miskel et al. (2022) avaliaram o estágio do ciclo celular como um fator determinante para a eficiência da edição gênica em zigotos bovinos submetidos à eletroporação. A análise comparativa entre embriões tratados antes e após a fase S, correspondente à replicação do DNA, mostrou que a aplicação precoce favorece maior frequência de mutações bialélicas completas e reduziu a ocorrência de mosaicismos, indicando que o momento da eletroporação é determinante para a uniformidade dos eventos de edição.

A composição do meio — especialmente condutividade, osmolaridade e temperatura — influencia a estabilidade dos poros e o grau de estresse celular durante o pulso (PUCIHAR et al., 2001). O emprego de endonucleases contribuiu para o aprimoramento das condições de eletroporação em zigotos, destacando-se as nucleases de dedo de zinco (ZFNs), as nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e o sistema CRISPR/Cas (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas/associada à proteína Cas). Esse conjunto de ferramentas promoveu ganhos expressivos de eficiência, alcançando resultados até duas vezes superiores aos obtidos pela microinjeção convencional, a qual, além de demandar elevado nível de habilidade técnica, apresenta maior risco de lesão embrionária e requer tempo adicional em comparação à eletroporação (KANEKO et al., 2014).

Por fim, revisões recentes ressaltam que a diversidade de equipamentos, protocolos e condições experimentais dificulta comparações diretas entre estudos, contribuindo para a variabilidade em eficiência de edição, mosaicismos e viabilidade embrionária (LIN e VAN EENENNAAM, 2021). Assim, embora a eletroporação de zigotos bovinos seja uma ferramenta poderosa para a geração de animais geneticamente editados, os principais desafios ainda incluem a otimização dos parâmetros elétricos, o controle do mosaicismos, a baixa eficiência de HDR e a falta de padronização metodológica.

3.2 TRANSGENIA

A transgenia é uma técnica avançada de engenharia genética que consiste na manipulação direta do material hereditário, possibilitando a transferência de genes entre espécies distintas. Essa abordagem rompe as barreiras naturais da reprodução, permitindo que informações genéticas sejam inseridas, removidas ou modificadas de maneira precisa dentro do genoma do organismo receptor. Com isso, torna-se possível conferir a esse organismo características que não estariam acessíveis por meio de cruzamentos convencionais ou técnicas clássicas de melhoramento (SHAKWEER et al., 2023).

Os animais transgênicos apresentam características genéticas específicas que foram introduzidas artificialmente por meio de técnicas de engenharia genética. Esse processo permite a inserção de genes de interesse que não estavam originalmente presentes em seu genoma, resultando na expressão de novas funções ou características. O uso desses animais tem grande relevância, pois possibilita a criação de modelos experimentais para o estudo de doenças humanas, além de aplicações terapêuticas, como a produção de proteínas recombinantes e outros produtos de interesse biomédico (GIBBONS et al., 2014).

De acordo com Gibbons et al. (2014), os animais geneticamente modificados desempenham um papel significativo nas pesquisas científicas, especialmente nas avaliações de eficácia de vacinas e nos estudos de terapia gênica, com o objetivo de desenvolver estratégias para o tratamento de doenças genéticas em humanos, tais como Alzheimer, HIV e diferentes tipos de câncer. Animais transgênicos têm sido usados para produzir proteínas humanas com características terapêuticas específicas, como anticoagulantes, fatores de crescimento, hormônios e enzimas. Desta forma, isso tem gerado grande interesse por parte de empresas da indústria farmacêutica.

O uso de animais transgênicos na área comercial apresenta ampla diversidade de aplicações. Essas estratégias têm permitido alcançar objetivos de grande relevância prática, como a melhoria na resistência dos animais a doenças e a introdução de características genéticas que favorecem maior produtividade, melhor eficiência reprodutiva e qualidade superior nos produtos de origem animal, como carne, leite e lã. Além disso, como já mencionada anteriormente, destaca-se também a utilização desses organismos na produção de proteínas recombinantes de interesse

farmacêutico, ampliando as possibilidades de obtenção de medicamentos e terapias inovadoras a partir de sistemas biológicos mais acessíveis e economicamente viáveis (GAMA SOSA et al., 2009).

Em 2006, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou a comercialização da primeira proteína farmacêutica recombinante, a antitrombina — proteína natural essencial para a regulação da coagulação sanguínea. Produzida no leite de cabras transgênicas, essa conquista representou um marco da biotecnologia aplicada à saúde humana. Outro campo de destaque é o xenotransplante, que consiste no uso de animais geneticamente modificados como potenciais doadores de órgãos para humanos, configurando-se como alternativa promissora diante da escassez de órgãos disponíveis para transplantes (GIBBONS et al., 2014).

Na geração de animais transgênicos podem ser empregados diferentes métodos para possibilitar a inserção de novos genes no genoma. Entre as técnicas mais utilizadas, destacam-se a microinjeção pronuclear, a transferência nuclear de células somáticas e a transferência de genes mediada por retrovírus, todas já consolidadas em diversos modelos experimentais. Além dessas, outras estratégias também são aplicadas, como a transferência gênica mediada por espermatozoides, a transfecção lipossomal e a eletroporação, que oferecem alternativas viáveis conforme a espécie, o tipo de célula-alvo e o objetivo específico da modificação genética (SAHOO et al., 2018).

3.3 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

A ativação partenogenética constitui um processo essencial para desencadear o desenvolvimento inicial de oócitos bovinos, que permanecem bloqueados em metáfase II até receberem um estímulo artificial capaz de mimetizar os sinais fisiológicos normalmente induzidos pelo espermatozoide (MÉO et al., 2007).

Tal bloqueio está associado à manutenção da atividade elevada do fator promotor da maturação (MPF), complexo proteico que sustenta o oócito nesse estágio. Em condições naturais, a fecundação promove a inativação gradual do MPF, permitindo a reorganização do ciclo celular e a retomada da meiose. Na ausência desse estímulo, os oócitos permanecem metabolicamente inativos, incapazes de

avançar para os estágios subsequentes do desenvolvimento embrionário (SIRARD, 2001).

A retomada da meiose e a progressão ordenada do ciclo celular, por sua vez, dependem diretamente de oscilações repetitivas na concentração intracelular de cálcio, consideradas o principal sinal molecular envolvido na ativação do oócito (MIYAZAKI et al., 1993). Durante a fecundação natural, esses pulsos são desencadeados pela entrada do espermatozoide, que libera fatores solúveis no citoplasma do oócito e desencadeia uma cascata de eventos moleculares, incluindo a retomada da meiose e a reorganização do fuso meiótico (MALCUIT et al., 2006). Na ausência dessas oscilações, o bloqueio meiótico não é rompido, inviabilizando o desenvolvimento embrionário.

Dentre as estratégias desenvolvidas, destaca-se a associação entre cálcio ionóforo e o inibidor 6-DMAP. O cálcio ionóforo promove a entrada rápida de íons cálcio no citoplasma, simulando o sinal inicial da fecundação. Já o 6-DMAP bloqueia a reativação do MPF, garantindo a estabilidade do processo e favorecendo a progressão do ciclo celular (PORCIÚNCULA, 2007). Essa combinação permite mimetizar, de forma controlada, tanto o sinal desencadeador quanto a sustentação necessária para que o oócito avance no desenvolvimento.

Embriões partenogênicos permitem testar protocolos de ativação em condições controladas e livres da variabilidade do gameta masculino. A associação de ionomicina e 6-DMAP mostrou-se altamente eficiente, promovendo rápida inativação do fator promotor da maturação (MPF) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), maiores taxas de clivagem e blastocisto, além de gerar embriões com melhor qualidade celular, caracterizada por proporções equilibradas entre massa celular interna e trofotoderma. Esses resultados reforçam seu valor como modelo experimental e como ferramenta estratégica para a biotecnologia reprodutiva (VALENCIA et al., 2023).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Experimento 1. Efeito da intensidade da voltagem de eletroporação no desenvolvimento de embriões bovinos partenogênicos

No primeiro experimento, avaliou-se o efeito da eletroporação sobre a viabilidade dos zigotos bovinos partenogênicos. Os zigotos foram submetidos a três pulsos de 0, 10, 15 ou 20 V, com intervalos de 50 ms, e em seguida cultivados em meio SOF. Após a eletroporação, foram transferidos para o meio de cultivo e avaliadas as taxas de clivagem (dia 3) e de formação de blastocistos (dia 7).

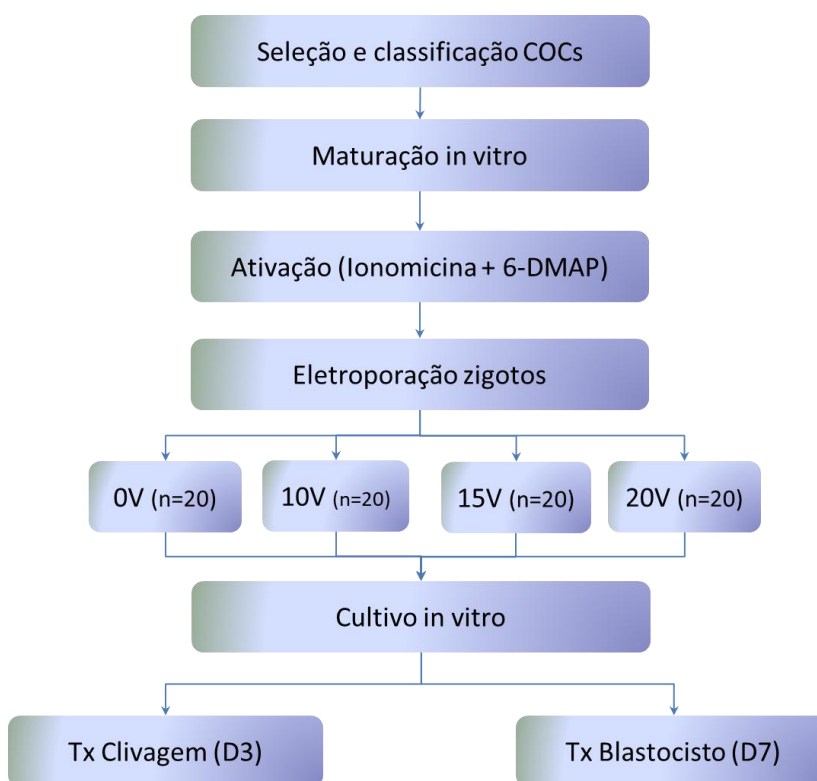


Figura 2: Fluxograma do experimento 1.

4.1.2 Experimento 2. Efeito da intensidade da voltagem de eletroporação na permeabilidade ao tetrametilrodamina (TMR) Dextran em zigotos bovinos

Os zigotos bovinos partenogênicos foram eletroporados em diferentes voltagens (0, 10, 15 e 20 V) utilizando três pulsos de 3 ms em intervalos de 50 ms, na presença de TMR-Dextran. Para avaliar a permeabilidade celular, os zigotos foram incubados em solução com TMR-Dextran e, em seguida, observados ao microscópio de fluorescência. A presença de fluorescência indicou a penetração do TMR-Dextran nas células.

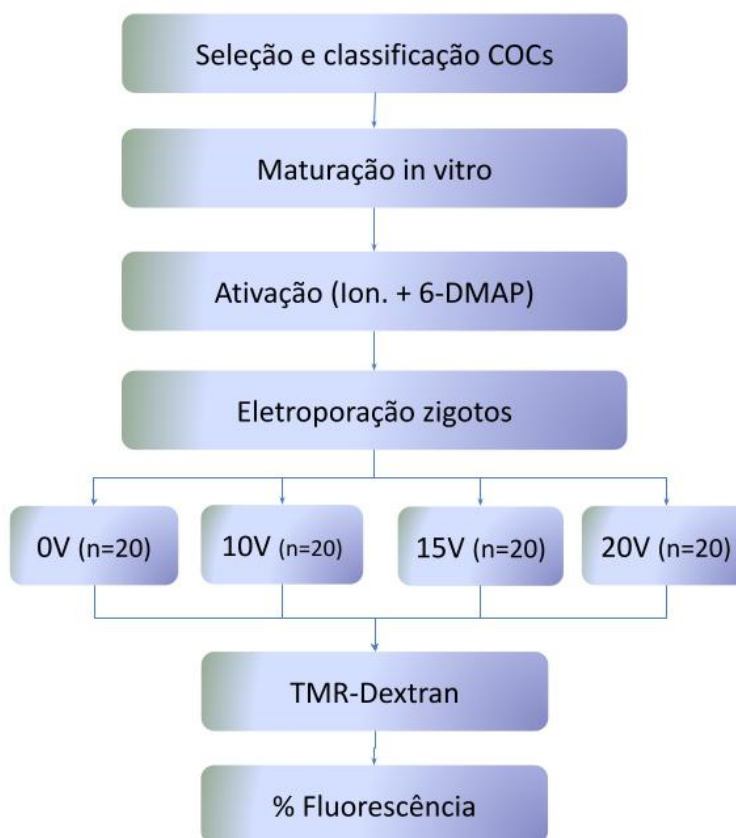


Figura 3: Fluxograma do experimento 2.

4.2. OBTENÇÃO DOS COCS

Ovários de vacas mestiças, cíclicas, de idades variadas, foram obtidos em abatedouros da região do município de Campos dos Goytacazes, RJ. Os ovários foram transportados até o laboratório em solução salina a 0,9% contendo antibióticos, a temperatura ambiente. No laboratório, os ovários foram colocados em béquer com solução salina aquecida a 37°C. A aspiração folicular foi realizada utilizando-se seringas (10 ml) e agulhas 19 “G” (40 x 1.2 mm). O fluido folicular contendo os COCs foi colocado em tubos cônicos de 50 mL contendo 5 ml de meio de lavagem (meio-199-HEPES acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos: 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), onde formaram um precipitado, que posteriormente foi aspirado com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para uma placa de Petri (100 x 15 mm). Os COCs foram selecionados e lavados cinco vezes em gotas de 100 µL de meio de lavagem antes de serem colocados no meio de maturação. Com auxílio de um estereomicroscópio, os COCs foram classificados em quatro categorias (I, II, III, IV), de acordo com o número de camadas e a compactação das células do cumulus (DE LOSS et al., 1989), além da transparência e homogeneidade do ooplasma. Somente os COCs classificados como grau I e II foram utilizados.

4.3. MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS

Após a lavagem, os COCs foram transferidos para gotas de 100 µL de meio de maturação (MIV - meio 199 acrescido de 5% de soro fetal bovino, 10 µL/mL de Gonal, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Os COCs (20/gota) foram mantidos em incubadora, sob atmosfera de 6% de CO₂, a 38,5°C, por 22h.

4.4 DESNUDAMENTO E ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS

Após a maturação, os oócitos foram desnudados por uma sequência de pipetagens em 500 µl de hialuronidase em TALP-sperm (1 mg/ml) em placa aquecida a 38,5°C, até que todas as células do cumulus sejam removidas por completo, deixando a zona pelúcida completamente exposta para a realização da próxima etapa.

A ativação partenogenética foi induzida pela incubação dos zigotos por cinco minutos em Ionomicina (5 μ M), diluída em 400 μ L de meio TCM-199 Hepes suplementado com 2% de soro fetal bovino e 4 mg/mL de BSA, seguido de mais três lavagens em gotas de 100 μ L de TCM Hepes 199 com 20% de Soro fetal Bovino (T20). Após estas lavagens, os oócitos foram incubados por um período de 4 horas em estufa a 38 °C, 6% de CO₂ e umidade máxima em gotas de 50 μ l de TALP-FEC acrescido de 6-DMAP (16,3 mg/ml).

4.5 ELETROPORAÇÃO

A eletroporação dos zigotos foi realizada usando o eletroporador ECM 830 (BTX) e uma lâmina de vidro com espaço de 1 mm entre os eletrodos. Os zigotos foram eletroporados após ativação partenogenética com pulsos definidos para diferentes voltagens iniciais (0, 10, 15, 20 V/mm, de acordo com o experimento), utilizando três pulsos de três ms em intervalos de 50 ms. A lacuna do eletrodo foi preenchida com 50 μ L de solução Opt-MEM. Grupos de 20 zigotos foram lavados e colocados em linha entre os eletrodos usando uma micropipeta e eletroporados à temperatura ambiente. Após a eletroporação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para placas de cultura e incubados durante 7 dias.

4.6 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Os zigotos bovinos partenogenéticos do grupo controle e os eletroporados foram lavados em três gotas de meio de cultivo (SOF) previamente preparado e estabilizado na incubadora e seguiram para o cultivo em gotas contendo meio SOF com 2,5% de SFB (100 μ l). As estruturas foram mantidas nas condições 5% de oxigênio, 5% de gás carbônico e 90% de nitrogênio durante sete dias.

Considerando como dia zero o dia da ativação partenogenética, a avaliação da clivagem foi realizada no dia três, junto ao feeding, com 5% de SFB. Nos dias 7 e 9, foi realizada a avaliação da taxa de blastocisto. No dia 9, foi anotado o número de estruturas em cada classificação.

4.7 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE AO DEXTRAN-RODAMINA

Para analisar o efeito da voltagem na permeabilidade da membrana, zigotos bovinos partenogênicos foram submetidos à eletroporação na presença de 2 mg/mL de Dextran marcado com tetrametilrodamina (TMR-Dextran), diluída em DPBS. Após a eletroporação, a presença do corante no citoplasma foi avaliada por microscopia de epifluorescência imediatamente após o procedimento, a fim de verificar a eficácia da permeabilização da membrana plasmática. As imagens obtidas foram registradas e analisadas no software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA), sendo realizada a quantificação dos valores de fluorescência total corrigida (CTCF).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito das diferentes voltagens de eletroporação sobre as variáveis taxa de clivagem, taxa de formação de blastocistos e permeabilidade foi analisado por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando identificadas diferenças significativas, procedeu-se à comparação múltipla entre os grupos utilizando o teste post hoc de Dunn, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Experimento 1

A análise da taxa de clivagem entre os tratamentos indicou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos Controle e 10 V. No entanto, o grupo submetido a 20 V apresentou a menor taxa de clivagem entre todos os grupos, com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Controle e ao grupo 10 V ($p < 0,05$).

A avaliação da taxa de blastocisto demonstrou que os grupos Controle apresentaram as maiores médias, sem diferença estatística significativa entre si. No entanto, o grupo Controle apresentou uma taxa significativamente superior em comparação aos grupos 15 V e 20 V ($p < 0,05$), evidenciando o impacto negativo da aplicação de voltagens mais elevadas sobre o desenvolvimento embrionário. O grupo 10 V também difere significativamente do grupo 20 V. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos 10 V e 15 V, nem entre os grupos 15 V e 20 V, embora esses dois últimos tenham apresentado as menores taxas entre todos os tratamentos.

Os resultados das taxas de clivagem e de formação de blastocisto dos zigotos bovinos partenogénéticos eletroporados de cada grupo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Taxas de clivagem e de formação de blastocisto de zigotos bovinos partenogênicos eletroporados com diferentes voltagens. As taxas de clivagem e blastocisto foram calculadas com base no número de zigotos cultivados. Sobrescritos diferentes indicam significância ao nível de 5%, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn.

Grupo de tratamento	Zigotos Eletroporados	% Perdas	Zigotos Cultivados	Clivagem n° (% \pm DP ¹)	Blastocisto n° (% \pm DP ¹)
Controle	140	3,6	135	84 (61,9% \pm 16,9 ^a)	43 (31,6 \pm 17,5 ^a)
10 V	140	8,6	128	82 (64,1% \pm 20,8 ^{ab})	26 (20,5 \pm 9,6 ^{ab})
15 V	140	8,6	128	61 (47,6 \pm 12,1 ^{abc})	12 (9,11 \pm 4,6 ^{bc})
20 V	140	10	126	38 (30,4 \pm 8,8 ^c)	8 (6,0 \pm 4,18 ^c)

¹ Desvio-padrão

Experimento 2

A análise de permeabilidade na presença de Dextran-Rodamina (3.000 Da), ilustrada na Figura 6, revelou um aumento progressivo da intensidade da fluorescência emitida pelos zigotos à medida que a voltagem aplicada foi elevada durante o processo de eletroporação.

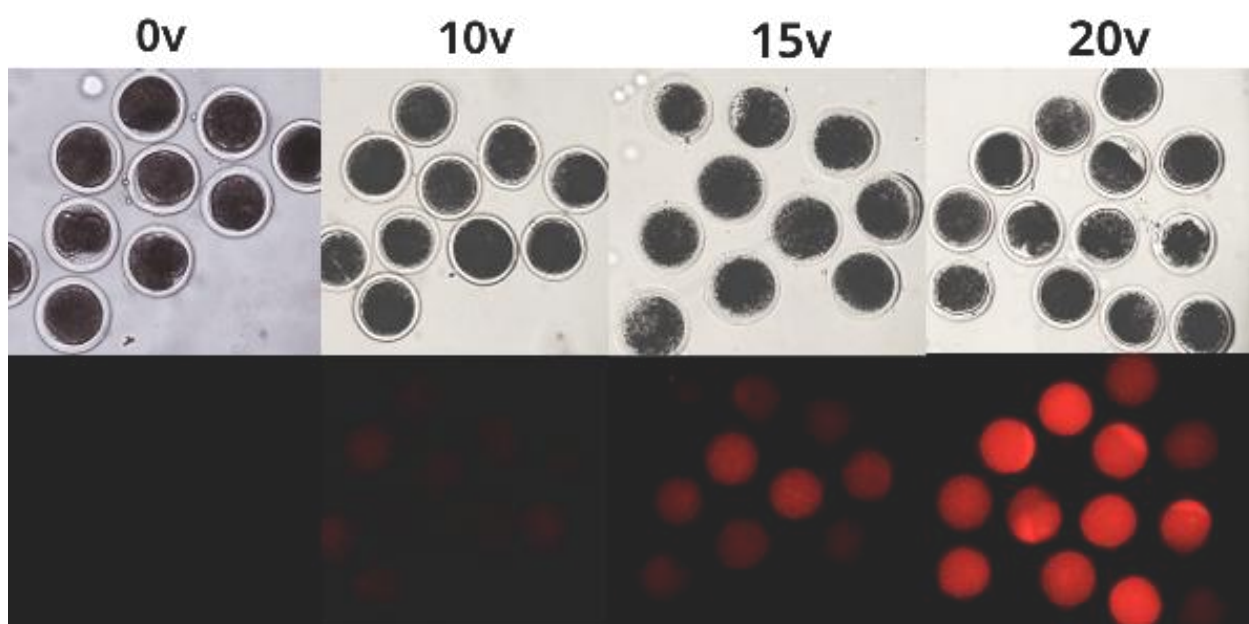


Figura 4: Microscopia em campo claro e de fluorescência de zigotos bovinos não eletroporados (0 V) ou com 3 pulsos de 10 V, 15 V ou 20 V na presença de Dextran-Rodamina (3.000 Da).

Conforme demonstrado nos resultados, a intensificação da voltagem aplicada promoveu alterações significativas nos valores de fluorescência total corrigida (CTCF) em zigotos bovinos partenogênicos submetidos à eletroporação, com diferenças estatísticas evidentes entre todos os grupos experimentais, exceto entre os grupos Controle e 10 V. Esses achados, apresentados na Figura 5, indicam que a intensidade do campo elétrico influencia diretamente a eficiência de incorporação do marcador fluorescente, refletida nos níveis crescentes de fluorescência detectados.

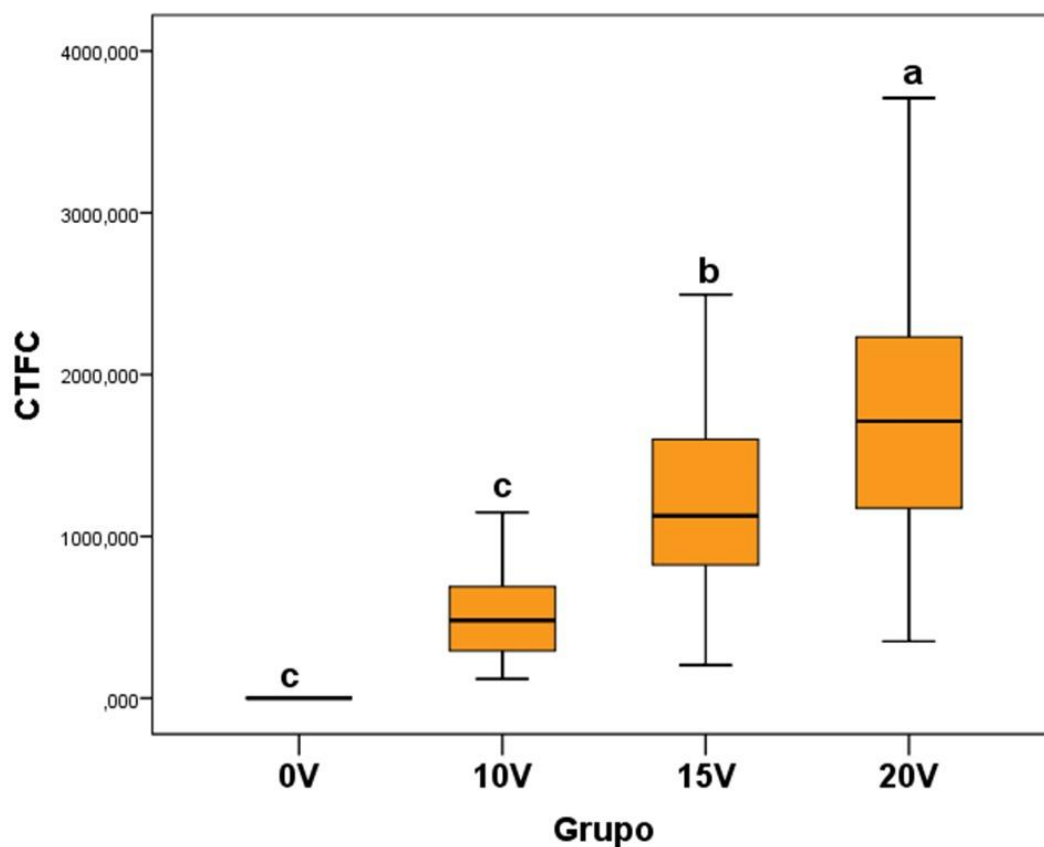


Figura 5: Fluorescência total corrigida (CTFC) de zigotos bovinos partenogênico eletroporados com 10 V, 15 V e 20 V na presença de Dextran-Rodamin 3.000.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo buscou investigar como diferentes voltagens aplicadas durante a eletroporação de zigotos bovinos influenciam tanto a viabilidade embrionária quanto a permeabilidade da membrana celular, avaliadas respectivamente pelas taxas de clivagem e de formação de blastocistos, bem como pela incorporação de marcador fluorescente tetrametilrodamina (TMR) Dextran indicativo da abertura de poros. Esses parâmetros representam indicadores fundamentais do desenvolvimento inicial, pois refletem a capacidade dos embriões de realizar as primeiras divisões celulares, sua progressão até estágios mais avançados, além de evidenciar o grau de permeabilização induzido pelo campo elétrico (NAMULA et al., 2019).

A compreensão desses efeitos é essencial para estabelecer o equilíbrio entre a eficiência da técnica, necessária para a introdução de moléculas exógenas, e a preservação da integridade celular, indispensável para o desenvolvimento embrionário adequado. Portanto, os resultados obtidos contribuem para a definição de parâmetros elétricos mais seguros e eficazes.

Em termos gerais, revisões recentes destacam a eletroporação como uma estratégia relevante para a manipulação de zigotos em diferentes espécies, visando à obtenção de animais geneticamente modificados. No entanto, ainda é necessário estabelecer um equilíbrio entre eficiência de transferência e manutenção da viabilidade embrionária (LIN e VAN EENENNAAM, 2021).

Os resultados mostraram que, quando os embriões foram submetidos a 10 V e 15 V, não houve diferença significativa na taxa de clivagem entre o grupo controle não eletroporado e os embriões submetidos à eletroporação. Contudo, a exposição a 20 V resultou em uma queda expressiva da clivagem, evidenciando o efeito deletério de intensidades de campo mais elevadas. Esses achados apontam que voltagens mais altas podem induzir danos irreversíveis à membrana plasmática e desencadear morte celular.

Estudos baseados em modelos matemáticos de eletroporação, por meio de simulações no software COMSOL Multiphysics®, reforçam essa interpretação ao demonstrar que a formação de poros é altamente dependente da amplitude e da duração do pulso elétrico. Nessas condições, pulsos de baixa intensidade promovem uma permeabilização transitória e reversível, permitindo a passagem de moléculas sem comprometer a viabilidade celular (PEREIRA et al., 2015). Em contraste,

amplitudes mais elevadas ultrapassam o limiar de tolerância da membrana, ocasionando eletroporação irreversível, danos celulares e morte celular por diferentes mecanismos, como apoptose, necrose, necroptose ou piroptose (BATISTA NAPOTNIK et al., 2021).

Em relação à taxa de formação de blastocistos, observou-se que o grupo tratado com 10 V apresentou desempenho semelhante ao controle. De forma consistente, Camargo et al. (2020) demonstraram que a eficiência da eletroporação em zigotos bovinos está diretamente relacionada à voltagem aplicada. Valores acima de 15 V, embora aumentem a permeabilidade da membrana, prejudicaram o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Ao testar a técnica para entrega de ribonucleoproteínas CRISPR/Cas9, o estudo validou sua eficiência por meio do knockout do gene OCT4, utilizado como modelo experimental.

Por outro lado, as voltagens mais altas, de 15 V e 20 V, exerceram efeito deletério sobre os embriões. Esses achados reforçam a relação inversa entre a intensidade da voltagem e a competência de desenvolvimento embrionário. Assim como observado no presente estudo, em que a eletroporação a 20 V reduziu a taxa de blastocistos, Namula et al. (2019) relataram que a aplicação de 20 V em zigotos bovinos, resultou em menor formação de blastocistos, embora tenha aumentado a eficiência de mutação no gene da miostatina (MSTN).

Nesse contexto, a eletroporação aplicada a zigotos bovinos partenogenéticos, reconhecidos como um modelo experimental consistente por eliminar a variabilidade inerente ao uso de sêmen na fertilização *in vitro* (FIV) e possibilitar uma ativação oocitária mais padronizada e controlada, constitui uma alternativa confiável para avaliar viabilidade e competência embrionária em condições controladas (VALENCIA et al., 2023).

Na presença de Dextran-Rodamina (3.000 Da), marcador utilizado para avaliar a permeabilidade dos zigotos, a técnica evidenciou a formação de poros transitórios na membrana plasmática. Esses poros permitiram a entrada do marcador no interior celular. No presente estudo, verificou-se que a intensidade da fluorescência aumentou proporcionalmente à voltagem aplicada, sendo menor no grupo de 10 V e maior no grupo de 20 V.

Esse achado confirma que a eficiência da eletroporação depende do número e do tamanho dos poros formados, controlados pela voltagem e pela duração do pulso.

Enquanto esses parâmetros favorecem a entrada de moléculas, quando excedidos resultam em permeabilização irreversível e perda da viabilidade embrionária (GOLZIO et al., 2002). Esse efeito também já foi relatado em modelos celulares, nos quais voltagens aumentaram a captação de moléculas exógenas (PEREIRA et al., 2015).

É importante destacar que o aumento da voltagem também pode comprometer a viabilidade celular, em razão da formação excessiva de poros e da indução de morte celular. Modelos matemáticos demonstram que, enquanto as regiões polares da membrana plasmática concentram maior densidade de poros, é nas regiões de transição que estes atingem maior diâmetro, contribuindo de forma decisiva para o aumento da permeabilização e, conseqüentemente, para a perda da integridade celular (DING et al., 2023).

Os resultados obtidos com o BTX ECM 830 mostram um padrão muito semelhante ao relatado por Namula et al. (2019), que utilizaram o eletroporador de onda quadrada simples CUY21EDIT II. Em ambos os estudos, observa-se que a faixa de 10–15 V/mm preserva a viabilidade embrionária, enquanto 20 V/mm provoca queda significativa nas taxas de clivagem e formação de blastocistos.

Esse comportamento difere parcialmente de Camargo et al. (2020), cujo uso do eletroporador NEPA21, baseado em pulsos multi-step, permitiu maior tolerância às voltagens testadas. Embora esses pesquisadores também tenham reportado redução no desenvolvimento em 20 V/mm, o impacto é menos pronunciado devido ao controle refinado dos pulsos no NEPA21. Portanto, a maior sensibilidade observada no ECM830 é coerente com sua arquitetura de pulsos simples, reforçando que a janela de segurança para eletroporação de zigotos bovinos nesse tipo de equipamento é consideravelmente mais estreita.

Os dados sugerem que a aplicação de 10 V representa um limiar seguro, mantendo taxas de clivagem e formação de blastocistos comparáveis ao controle (MIAO et al., 2019), e permitindo a abertura de poros na membrana. Já as voltagens mais elevadas excedem a tolerância embrionária (HASHIMOTO; TAKEMOTO, 2015), confirmando a necessidade de otimização da intensidade do campo elétrico para o sucesso da técnica em diferentes espécies.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que a aplicação de 3 pulsos de 15 V ou 20 V durante a eletroporação prejudicou a viabilidade embrionária de zigotos bovinos, reduzindo as taxas de desenvolvimento. Em contrapartida, a voltagem de 10 V mostrou-se mais adequada, pois manteve a qualidade embrionária semelhante ao grupo controle e possibilitou a permeabilização eficiente da membrana celular, sendo, portanto, a condição mais promissora para protocolos de transfecção de fragmentos de DNA até 3.000 Da em zigotos bovinos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA NAPOTNIK, T.; POLAJŽER, T.; MIKLAVČIČ, D. Cell death due to electroporation – A review. **Bioelectrochemistry**, v. 141, p. 107871, 2021.

CAMARGO, L. S. A.; OWEN, J. R.; VAN EENENNAAM, A. L.; ROSS, P. J. Efficient one-step knockout by electroporation of ribonucleoproteins into zona-intact bovine embryos. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 570069, 2020.

DIALLO, C. K.; MODZELEWSKI, A. J. Efficient genome editing of mice by CRISPR electroporation of zygotes. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2022, n. 190, 2022.

DING, L.; FANG, Z.; MOSER, M. A. J.; ZHANG, W.; ZHANG, B. A single-cell electroporation model for quantitatively estimating the pore area ratio by high-frequency irreversible electroporation. **Applied Sciences**, v. 13, n. 3, p. 1808, 2023.

DU, X.; QUINN, A.; MENZIES, M.; PORTO-NETO, L. R. Optimizing the delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for efficient genome editing in bovine embryos. **Gene**, v. 966, p. 149715, 2025.

GAMA SOSA, M. A.; DE GASPERI, R.; ELDER, G. A. Animal transgenesis: an overview. **Brain Structure and Function**, v. 214, n. 2-3, p. 91–109, 2009.

GIBBONS, A. E.; BEVACQUA, R. J.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; PEREYRA BONNET, F. A.; CUETO, M.; BRUNO GALARRAGA, M. M.; SALAMONE, D. F. Transgénesis: una moderna biotecnología reproductiva en animales de interés zootécnico. **RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 40, n. 2, p. 141-144, 2014.

GOLZIO, M.; TEISSIE, J.; ROLS, M. P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1292–1297, 2002.

HASHIMOTO, M.; TAKEMOTO, T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

HELLER, L. C.; HELLER, R. In vivo electroporation for gene therapy. **Human Gene Therapy**, v. 17, n. 9, p. 890–897, 2006.

KANEKO, T.; SAKUMA, T.; YAMAMOTO, T.; MASHIMO, T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6382, 2014.

LIN, J. C.; VAN EENENNAAM, A. L. Electroporation-mediated genome editing of livestock zygotes. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2021.

MALCUIT, C.; KUROKAWA, M.; FISSORE, R. A. Calcium oscillations and mammalian egg activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 206, n. 3, p. 565–573, 2006.

MARIE-PIERRE, R. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 3, p. 423–428, 2006.

MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; PERECIN, F.; SARAIVA, N. Z.; LEAL, C. L. V.; GARCIA, J. M. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. **Zygote**, v. 15, p. 295–306, 2007.

MIAO, D.; IANELLO GIASSETTI, M.; CICCARELLI, M.; LOPEZ-BILADEAU, B.; OATLEY, J. M. Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 1, p. 177–187, 2019.

MIR, L. M.; BUREAU, M. F.; GEHL, J.; RANGARA, R.; ROUY, D.; CAILLAUD, J. M.; DELAERE, P.; BRANELLEC, D.; SCHWARTZ, B.; SCHERMAN, D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4262–4267, 1999.

MISKEL, D.; POIRIER, M.; BEUNINK, L.; RINGS, F.; HELD, E.; THOLEN, E.; TESFAYE, D.; SALILEW-WONDIM, D.; GROSSE-BRINKHAUS, C.; BRENNIG, B.; HOELKER, M. The cell cycle stage of bovine zygotes electroporated with CRISPR/Cas9-RNP affects frequency of loss-of-heterozygosity editing events. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKADA, K.; HONDA, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. **Developmental Biology**, v. 158, p. 62–78, 1993.

NAMULA, Z.; WITTAYARAT, M.; HIRATA, M.; HIRANO, T.; NGUYEN, N. T.; LE, Q. A.; FAHRUDIN, M.; TANIHARA, F.; OTOI, T. Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 55, n. 8, p. 598–603, 2019.

NEUMANN, E.; SCHÄFER-RINK, S.; TESCHKE, W.; BURRI, C.; GOLDBECK, I. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal**, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982.

PEREIRA, L. S.; PINTARELLI, G. B.; SUZUKI, D. O. H. Estudo da formação de poros na membrana durante a eletroporação de células biológicas. **Proceedings of the COMSOL Conference in Curitiba**, v. 1, p. 1, 2015.

PORCIUNCULA, P. M. Ativação partenogenética de oócitos bovinos jovens com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio. Mestrado – Pirassununga – SP, Universidade de São Paulo, 80p., 2007.

PUCIHAR, G.; KRASSOWSKA, W.; MIKLAVČIČ, D. The influence of medium conductivity on electroporation and survival of cells in vitro. **Bioelectrochemistry**, v. 54, n. 2, p. 107–115, 2001.

RAKOCZY, K.; SZALAI, G.; VÍGH, L.; KISS, T.; TÓTH, Z. Electroporation in clinical applications—The potential of gene electrotransfer and electrochemotherapy. **Applied Sciences**, v. 12, n. 21, p. 10821, 2022.

ROSAZZA, C.; DESCHOUT, H.; MICHAUX, C.; LEMIÈRE, F.; ROLS, M. P. Gene electrotransfer: a mechanistic perspective. **Current Gene Therapy**, v. 16, n. 2, p. 98–129, 2016.

RUZGYS, P.; JOKŪBAUSKAS, M.; ŠATKAUSKAS, S. Effect of electroporation medium conductivity on exogenous molecule transfer to cells in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

SAHOO, M.; PANDA, S. K.; DAS, P. Genesis of transgenic animals. **International Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 518–521, 2018.

SHAKWEER, W. M. E.; EL-SAYED, H. S.; AHMED, H. A.; HASSAN, A. M. A review of transgenic animal techniques and their applications. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, n. 1, 2023.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 2001.

VALENCIA, C.; RODRÍGUEZ, J. F.; GÓMEZ, L.; PARRA, D.; RESTREPO, J. C.; CELY, A.; DUARTE, M.; GÓMEZ, M. F. Combined exogenous activation of bovine oocytes: effects on maturation-promoting factor, mitogen-activated protein kinases, and embryonic competence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15794, 2023.