

[Cod. Trabalho : 1920]

PÔSTER

CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

OTIMIZAÇÃO DO MEIO E DA TEMPERATURA PARA RECUPERAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOÍDES SUÍNOS SUBMETIDOS A ELETROPORAÇÃO

ZIGOMAR DA SILVA¹; ANDRESSA P. SOUZA²; BRUNA F. V. SUPERTI³; CARLOS ANDRÉ DA VEIGA LIMA ROSA⁴; MARIANA GROKE MARQUES⁵.

1,2,4. UDESC, LAGES - SC - BRASIL; 3. UPF, PASSO FUNDO - RS - BRASIL; 5. EMBRAPA SUÍNOS E AVES, CONCORDIA - SC - BRASIL.

Palavras-chave: Eletroporação; Transfecção; Suíno

Resumo:

A eletroporação (EP), é um método eficaz de transfecção de espermatozoides. Seu sucesso depende, entre outras coisas, do meio usado para a EP e na recuperação celular pós EP. A permeabilização na membrana celular na EP deve ser apenas suficiente à internalização da substância desejada. Após a EP é ideal que as células permaneçam em meio e temperatura que permitam a regeneração de suas membranas. Assim, o objetivo deste estudo foi estabelecer para espermatozoides suínos submetidos a eletroporação, em condições de baixa e alta intensidade, o meio e a temperatura de incubação pós EP que proporcionem maior recuperação da integridade da membrana plasmática (RIMP). Para isso, utilizou-se doses inseminantes de 10 machos de linhagens comerciais, as quais foram diluídas em BTS para obtenção de amostras com 200µl e 2×10^6 spzt/ml e compuseram os grupos experimentais. Após a EP em duas diferentes condições (500 volts, 250µs e 1 pulso (EP1) ou 1000 volts, 500µs e 2 pulsos (EP2), as amostras foram recuperadas em quatro diferentes condições: mTBM (modified Tyrodes Buffered Medium) a 17°C ou a 37°C, ou BTS a 17°C ou a 37°C. O iodeto de propídio (PI), corante impermeável à membrana foi utilizado como molécula repórter. Cada amostra foi eletroporada no Multiporator® (Eppendorf AG), usando BTS, a temperatura ambiente (22°C). Após a EP, centrifugou-se as amostras a 9000 x g por 3 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200µl de BTS ou mTBM e incubou-se por 30 minutos a 17°C ou 37°C, conforme seu respectivo grupo experimental. Após, analisou-se as amostras por citometria de fluxo (BD Accuri™C6), para mensuração da taxa de incorporação de PI, em três momentos, antes da EP (PI0), logo após a EP (PI1) e 30 minutos após a recuperação (PI2). A taxa de RIMP se deu pela fórmula $RIMP = (PI2 - PI0) - (PI1 - PI0)$, sendo que quanto menor o valor, melhor a RIMP. Para análise estatística utilizou-se o PROC MIXED (SAS, versão 9.2 para Windows), com comparações utilizando o Teste Tukey, análise de interação entre as variáveis e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Houve interação entre o meio e a temperatura ($p = 0,0008$). O BTS a 17°C teve uma RIMP de $-9,94\% \pm 5,91$, única combinação capaz de recuperar as membranas acima dos valores do período pré-recuperação, sendo mais eficiente que o mTBM a 17°C ($32,5\% \pm 5,91$) ($p < 0,0001$), porém sem diferença com o BTS a 37°C ($14,04\% \pm 6,61\%$) ($p = 0,0525$) e o mTBM a 37°C ($10,38\% \pm 6,27$) ($p = 0,1085$). Observou-se também interação entre a EP e o meio utilizado ($p = 0,0471$). O meio mTBM utilizado juntamente com a EP2 apresentou piores resultados que os demais grupos, apresentando RIMP de $35,82\% \pm 6,27$, sendo o meio BTS com a EP1 foi de $0,49\% \pm 6,27$ ($p = 0,0022$) e para EP2 $3,60\% \pm 6,27$ ($p = 0,0056$) e o meio mTBM e EP1 foi de $7,06\% \pm 5,91$ ($p = 0,0018$). Este estudo demonstrou que, em geral, o meio BTS, principalmente a 17°C, apresentou-se mais eficiente na recuperação integridade da membrana plasmática de espermatozoides suínos submetidos a eletroporação.

MEDIUM AND TEMPERATURE OPTIMIZATION FOR THE RECOVERY OF MEMBRANE INTEGRITY OF SWINE SPERMATOZOA SUBMITTED TO ELECTROPORATION

ZIGOMAR DA SILVA¹; ANDRESSA P. SOUZA²; BRUNA F. V. SUPERTI³; CARLOS ANDRÉ DA VEIGA LIMA ROSA⁴; MARIANA GROKE MARQUES⁵.

1,2,4. UDESC, LAGES - SC - BRASIL; 3. UPF, PASSO FUNDO - RS - BRASIL; 5. EMBRAPA SUÍNOS E AVES, CONCORDIA - SC - BRASIL.

keyword: Electroporation;Transfection;Swine

Abstract:

Electroporation (EP) is an efficient method for transfection of sperm cells. The success of EP depends, among other things, on the use of the appropriate medium during PE and on cell recovery post EP. The membrane permeabilization in the PE should only be for a sufficient internalization of the desired substance and after EP, it is ideal that the cells remain in medium and temperature that allow their membranes to regenerate. Therefore, the aim of this study was to establish for the electroporation of swine spermatozooids under conditions of low and high stress the medium and incubation temperature post EP that provide greater recovery of plasma membrane integrity (RPMI). Dilution of inseminating doses of 10 males of commercial strains were in BTS to obtain samples with 200µl and 2×10^6 spzt / ml, which composed the experimental groups. After EP in two different conditions (500 volts, 250µs and 1 pulse (EP1) or 1000 volts, 500µs and 2 pulses (EP2), the samples were recovered in four different conditions: mTBM (modified Tyrodes Buffered Medium) at 17°C or 37°C, or BTS at 17°C. Propidium iodide (PI), one membrane impermeable fluorescent dye was the reporter molecule. Each sample was electroporated into Multiporator® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) using BTS at room temperature (22°C). Then, centrifuging of samples were at 9100 G for 3 minutes, the supernatant was removed and 200 µl of BTS or mTBM was added and incubated for 30 minutes at 17°C or 37°C according to their respective experimental group. Analysis of samples were by flow cytometry (BD Accuri™ C6) for measuring the rate of incorporation of PI, which occurred in three moments, before EP (PI0), just after EP (PI1) and 30 minutes after recovery (PI2). The calculation of RPMI rate was by the formula: $RPMI = (PI2-PI0) - (PI1-PI0)$. The lowest value found indicates the best RPMI. For statistical analysis, PROC MIXED (SAS, version 9.2 for Windows) was used, with comparisons using the Turkey test, analysis of interaction between variables and significance level of 5% ($p < 0.05$). There was interaction between the medium and the temperature ($p=0.0008$). The BTS at 17°C had a RPMI of $-9.94\% \pm 5.91$, the only combination capable of recovering membranes above pre-recovery values, being more efficient than the mTBM at 17°C ($32.5\% \pm 5.91$) ($p < 0.0001$), but with no difference with BTS at 37°C ($14.04\% \pm 6.61\%$) ($P=0.0525$) and mTBM at 37°C ($10.38\% \pm 6.27$) ($p=0.1085$). Interaction between the EP and the medium used ($p=0.0471$) was also observed. The mTBM medium when used together with EP2 presented worse results than the other groups, presenting RPMI of $35.82\% \pm 6.27$, being the BTS medium with EP1 was $0.49\% \pm 6.27$ ($p=0.0022$) and for EP2 $3.60\% \pm 6.27$ ($p=0.0056$) and the mTBM and EP1 medium was $7.06\% \pm 5.91$ ($p = 0.0018$). This study demonstrated that, in general, the BTS medium, mainly at 17°C, was more efficient in recovering integrity of the plasma membrane of swine spermatozoa submitted to electroporation.

Premiação: Não quero participar