



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Daniely Ramos Luz

**Otimização da técnica de eletroporação de construção plasmidial de DNA em embriões  
de *Gallus gallus***

Florianópolis

2023

Daniely Ramos Luz

**Otimização da técnica de eletroporação de construção plasmidial de DNA em embriões  
de *Gallus gallus***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis

2023

Luz, Daniely Ramos

Otimização da técnica de eletroporação de construção plasmidial de DNA em embriões de Gallus gallus / Daniely Ramos Luz ; orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2023.  
63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. eletroporação in ovo; células da Crista Neural Cefálica; manipulação genética..  
I. Garcez, Ricardo Castilho. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Daniely Ramos Luz

**Otimização da técnica de eletroporação de construção plasmidial de DNA em embriões de  
*Gallus gallus***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciada e  
aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 05 de dezembro de 2023.

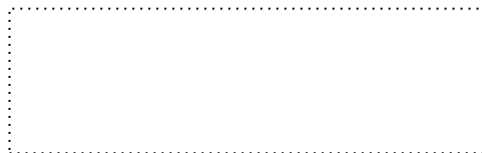


Coordenação do Curso


**Banca examinadora**



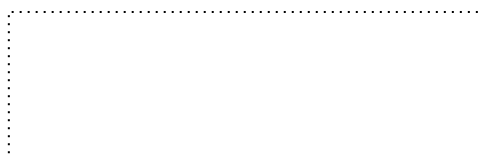
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Giordano Vosgrau Calloni  
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Talita da Silva Jeremias  
Universidade Federal de Santa Catarina



Me. Camila Santos de Souza  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023

Dedico este trabalho a todas e todos que empregarem tempo na sua leitura. Que cada página seja uma fonte de conhecimento e inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero expressar minha gratidão à Universidade Federal de Santa Catarina por proporcionar um ambiente culturalmente enriquecedor, acolhedor e diversificado. Nessa instituição, tive a oportunidade de participar de aulas com excelentes professores e professoras, fazer amizades verdadeiras e contribuir para diversos projetos de ensino, pesquisa e extensão universitária. Essas experiências moldaram parte de quem sou hoje e por isso sou profundamente grata por todas as oportunidades proporcionadas pela UFSC. Agradeço ao Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) por oferecer um espaço com suporte e disponibilidade de equipamentos de alta qualidade que contribuem para o avanço das investigações em nosso campo. Agradeço ainda ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por seu compromisso em impulsionar a pesquisa científica no Brasil, permitindo-nos realizar investigações que impactam positivamente a sociedade e o progresso científico como um todo.

Meu reconhecimento especial vai para meu orientador, Ricardo Castilho Garcez, que me permitiu vivenciar a universidade de uma forma única e significativa. Gostaria de expressar minha profunda gratidão por sua orientação ao longo desses anos. Sua dedicação e apoio foram essenciais para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Sou muito feliz por ter tido a sorte de encontrar um orientador tão empático e com tanta disposição para ensinar. Sou grata não apenas pelos conhecimentos técnicos que adquiri, mas em especial pela confiança que você depositou em mim, e pela forma como você impulsionou minha autoconfiança. Agradeço sinceramente por compartilhar seus conhecimentos, paixão e experiência, influenciando não apenas meu percurso acadêmico, mas também minha visão sobre o impacto transformador de cada indivíduo e da ciência em nossa sociedade. Professor Ricardo, obrigado por ser um orientador excepcional, por inspirar minha busca pelo conhecimento científico e por acreditar em meu potencial, mesmo quando eu duvidava. Seu trabalho e dedicação são verdadeiramente notáveis e admiráveis.

Em nome das professoras Yara Muniz e Patricia Stocco, expresso meu profundo agradecimento aos professores com os quais tive o privilégio de aprender. Agradeço àqueles que foram além dos conteúdos do currículo, mostrando que o ato de ensinar é um compromisso real e constante com o futuro que desejamos construir. São profissionais como vocês que moldam um amanhã melhor. Em especial, agradeço aqui ao professor Giordano Wosgrau Calloni que esteve sempre prontamente à disposição para me auxiliar dentro e fora da sala de aula e que fez a ponte que me permitiu ingressar no Lacert.

Expresso minha gratidão aos colegas do laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual da UFSC, incluindo Maiara, Victor, Bianca, Monique, Pri, Thais, Karynne e demais colegas, pelas trocas valiosas e experiências compartilhadas. Agradeço especialmente ao "povinho do Ricardo/da biomol" - Gabriel, Alessandra, Jaque, Fernanda, Felipe, Lucas, Camila, Nathali e Peterson -pelo compartilhamento de bancada, pelos ensinamentos passados, pelas risadas que demos juntos e pelos laços de amizade que formamos. Fazer pesquisa ao lado de vocês tornou tudo mais especial! Agradeço também às professoras Talita e Andréa pelo acolhimento no laboratório, pelas contribuições nos seminários e pelas festas que tivemos.

Estendo meus agradecimentos às colegas de curso que se tornaram verdadeiras amigas, Raphaella, Aline, Duda e Laura, assim como às amigas construídas na Simbs: Polli, Beth, Vitória, Oke, Kelly, Carol e Isa. Cada uma de vocês tem um espaço especial no meu coração!

Agradeço às amigas e aos amigos que fiz ao longo da vida e com os quais tenho o prazer de partilhar momentos únicos e especiais que moldaram parte de quem sou: Renata, Maria, Faria, Lucas, José, Amanda e Matheus.

Aos amigos e companheiros e companheiras de luta, Alex, Vitor, Brenda, Julia, Larissa, Thiago e Maria Clara, minha gratidão por me ajudarem a compreender o significado político e a importância da nossa participação em todos os espaços. Agradeço por sempre estarem presentes na luta por justiça social e pela empatia que tiveram comigo, bem como por me ensinarem na prática o significado de companheirismo. Estendo este agradecimento aos membros do Coletivo PARATODOS – SC, que constroem na base o movimento estudantil do nosso estado.

Agradeço a meu pai e minha mãe pelo esforço em proporcionar uma das melhores experiências da minha vida: ser aluna de uma universidade pública, gratuita e de qualidade, que ampliou minha compreensão do mundo.

Expresso minha gratidão aos meus irmãos e irmãs, Alan, Dayane, Tiago e em especial à Michele, que sempre torceu por mim e me apoiou incondicionalmente em cada passo dado. Você é um exemplo de perseverança e prova-viva do poder transformador da educação.

Também dedico meus agradecimentos à Alice, que personifica o afeto e o cuidado todos os dias. Obrigada por sempre oferecer um abraço amigo e palavras de consolo e incentivo. Poucos têm a sorte que eu tenho de ter uma sogra como você.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de expressar a minha profunda gratidão ao meu namorado, companheiro de luta e parceiro de vida, David Selhorst, por todo o apoio inabalável que você me ofereceu. Agradeço por nunca duvidar do meu potencial, mesmo nos

momentos em que eu mesma duvidava. Sua confiança em nossos sonhos compartilhados e na minha capacidade de superar obstáculos tem sido um farol no meu dia a dia. Estou imensamente grata por ter um parceiro tão incrível como você, alguém que não apenas partilha os momentos de felicidade, mas que também enfrenta as adversidades de mãos dadas comigo. Muito obrigada, por ser meu apoio incondicional, minha fonte de alegria e o verdadeiro companheiro de todas as horas. Nossa jornada tem sido extraordinária, e mal posso esperar para enfrentar o futuro ao seu lado.



“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...” – Rubem Alves

## RESUMO

O estudo da biologia do desenvolvimento é fundamental na compreensão dos complexos e instigantes processos que conduzem a formação e diferenciação de organismos multicelulares. Nesse contexto, as células da Crista Neural (CN) desempenham um papel crucial no desenvolvimento dos vertebrados, contribuindo para a formação de estruturas importantes como nervos periféricos, glândulas, ossos e cartilagens craniofaciais. O destino e a diferenciação da CN dependem de uma rede regulatória de genes. Compreender como esses genes são ativados, regulados e interagem durante o desenvolvimento é essencial para desvendar os segredos da morfogênese e da especialização celular. A técnica de eletroporação destaca-se como uma ferramenta valiosa para essa investigação. Ao permitir a introdução eficiente de material genético nas células, a eletroporação possibilita a manipulação controlada da expressão de genes, podendo oferecer *insights* precisos sobre a função dos genes envolvidos no desenvolvimento, permitindo uma melhor compreensão dos eventos moleculares que moldam o desenvolvimento embrionário. O objetivo central deste trabalho foi padronizar um protocolo para a execução otimizada da técnica de eletroporação *in vivo* em embriões de *Gallus gallus domesticus*, com enfoque nas células da CN. Para otimizar a técnica, foram realizados experimentos de eletroporação *in ovo* utilizando uma construção de DNA plasmidial CAGGS-EGFP. Variações na voltagem da eletroporação (3, 6, 9, 12 e 15 volts) foram realizadas a fim de encontrar a melhor condição. Os resultados indicaram que eletroporações realizadas a 12 volts foram mais eficientes para a transfecção. O uso de voltagens maiores mostrou-se diretamente proporcional ao aumento da mortalidade e intensificou a manifestação de malformações embrionárias. O protocolo aplicado revelou-se eficiente na marcação das células da CN na região cefálica do embrião. Além disso, a expressão persistente da proteína EGFP, utilizada como *reporter*, foi observada até pelo menos 72 horas após a eletroporação. Essas conclusões ressaltam a necessidade de otimização cuidadosa dos parâmetros experimentais para alcançar resultados eficientes e robustos. Assim, a combinação do estudo da biologia do desenvolvimento, com foco nas células da CN, e a aplicação da técnica de eletroporação abre novas perspectivas para desvendar os mistérios da formação e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário, promovendo avanços significativos no conhecimento biológico e potencialmente contribuindo para aplicações terapêuticas com foco nas neurocristopatias.

**Palavras-chave:** eletroporação *in ovo*; células da Crista Neural Cefálica; manipulação genética.

## ABSTRACT

The study of developmental biology is crucial for understanding the complex and intriguing processes that lead to the formation and differentiation of multicellular organisms. In this context, Neural Crest (NC) cells play a crucial role in vertebrate development, contributing to the formation of important structures such as peripheral nerves, glands, bones, and craniofacial cartilage. The fate and differentiation of NC cells depend on a regulatory gene network. Understanding how these genes are activated, regulated, and interact during development is essential to unravel the secrets of morphogenesis and cell specialization. Electroporation stands out as a valuable tool for this investigation. By allowing efficient introduction of genetic material into cells, electroporation enables controlled manipulation of gene expression, providing precise insights into the function of genes involved in development and a better understanding of the molecular events shaping embryonic development. The central objective of this work was to standardize a protocol for the optimized execution of *in vivo* electroporation in embryos of *Gallus gallus domesticus*, with a focus on NC cells. To optimize the technique, *in ovo* electroporation experiments were conducted using a CAGGS-EGFP plasmid DNA construct. Electroporation voltage variations (3, 6, 9, 12, and 15 volts) were tested to find the optimal condition. The results indicated that electroporations at 12 volts were more efficient for transfection. The use of higher voltages was directly proportional to increased mortality and intensified the occurrence of embryonic malformations. The applied protocol proved effective in labeling NC cells in the embryonic cephalic region. Furthermore, persistent expression of the EGFP protein, used as a reporter, was observed for at least 72 hours after electroporation. These findings emphasize the need for careful optimization of experimental parameters to achieve efficient and robust results. Thus, the combination of developmental biology studies, with a focus on NC cells, and the application of electroporation opens new perspectives for unraveling the mysteries of cell formation and differentiation during embryonic development, promoting significant advances in biological knowledge and research.

**Keywords:** *in ovo* electroporation; Cephalic Neural Crest cells; genetic manipulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Disposição da Crista Neural ao longo do eixo ântero-posterior, formação do tubo neural e das células da CN e fenótipos derivados da CN. ....	19
Figura 2 – Domínios da CN ao longo do eixo anteroposterior, rotas de migração e células e estruturas derivadas da CN. ....	21
Figura 3 – Rotas de migração e estruturas craniofaciais derivadas da Crista Neural. ....	21
Figura 4 – Estrutura Plasmidial. ....	24
Figura 5 - Esquema da disposição dos eletrodos durante execução da eletroporação <i>in ovo</i> e detalhes da onda quadrada. ....	30
Figura 6 – Alterações morfológicas consideradas malformações durante o estudo. ....	32
Figura 7 – Identificação de marcações para EFGP falsas positivas. ....	33
Figura 8 – Esquema de regionalização para marcações na Crista Neural. ....	34
Figura 9 – Medidas da Vesícula Ótica. ....	35
Figura 10 – Etapas da produção do plasmídeo para a expressão da Proteína Fluorescente Verde: transfecção de bactérias, ampliação, purificação, teste em gel de eletroforese e dosagem. ....	38
Figura 12 – Eficiência da eletroporação (%) para diferentes voltagens. ....	39
Figura 13 – Taxa de mortalidade embrionária em função da voltagem aplicada na eletroporação: ....	41
Figura 14 – Taxa de malformações embrionárias (%) em função da voltagem aplicada na eletroporação: ....	42
Figura 15 – Intensidade das marcações de EGFP em função da variação da voltagem na eletroporação. ....	43
Figura 16 – Persistência da expressão de EGFP após eletroporação. ....	45
Figura 17 – Posição das marcações de EGFP: ....	46
Figura 18 – Domínios da CN com marcações do plasmídeo CAGGS-EGFP: ....	47

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Distribuição das amostras nos poços do gel de agarose 1%.....	27
Tabela 2 – Lista de materiais utilizados na eletroporação.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1°AB	Primeiro Arco Branquial;
2°AB	Segundo Arco Branquial;
AmpR	Gene de resistência a Ampicilina
BU	Biblioteca Universitária;
CCA	Centro de Ciências Agrárias;
CCN	Células da Crista Neural;
CDQ	Coeficiente de Dispersão Quartil;
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança;
CMV	Citomegalovírus Humano;
CN	Crista Neural;
CNC	Crista Neural Cefálica;
CNS	Crista Neural Sacral;
CNT	Crista Neural Truncal;
CNV	Crista Neural Vagal;
Co	Coração;
DDP	Diferença de Potencial;
DH5 $\alpha$	Cepa de <i>Escherichia coli</i> ;
Di	Diencéfalo;
DNA	Ácido Desoxirribonucleico;
EGFP	Proteína Fluorescente Verde Aprimorada;
HH	Hamburger-Hamilton;
LACERT	Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual;
ME	Mesencéfalo;
NB2/OGM	Nível de Biossegurança 2 para Organismos Geneticamente Modificados;
OI	Olho;
Pb	Pares de base;
pCAGGS-EGFP	DNA plasmidial (promotor CAGGS que controla a expressão de EGFP)
RNA	Ácido Ribonucleico;
Ro	Rombencéfalo;
rpm	Rotação por minuto;
SNC	Sistema Nervoso Central;

TE	Telencéfalo;
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal;
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina;
UV	Ultravioleta;
VO	Vesícula Ótica.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	A TÉCNICA DE ELETROPORAÇÃO .....	16
1.2	ELETROPORAÇÃO EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> .....	18
1.3	CÉLULAS DA CRISTA NEURAL .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1	PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO QUE PERMITA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EGFP EM CÉLULAS DE <i>G. GALLUS</i> .....	24
3.1.1	<b>Transfecção de bactéria com plasmídeo CAGGS-EGFP.....</b>	<b>25</b>
3.1.2	<b>Extração do plasmídeo CAGGS-EGFP.....</b>	<b>26</b>
3.1.3	<b>Avaliação da integridade do plasmídeo CAGGS-EGFP.....</b>	<b>27</b>
3.1.4	<b>Dosagem do plasmídeo .....</b>	<b>27</b>
3.2	ELETROPORAÇÃO.....	28
3.2.1	<b>Materiais.....</b>	<b>28</b>
3.2.2	<b>Passo a passo para execução do protocolo de eletroporação .....</b>	<b>29</b>
3.2.2.1	<i>Obtenção e preparação dos embriões para a eletroporação.....</i>	<i>29</i>
3.2.2.2	<i>Configuração do Eletroporador.....</i>	<i>29</i>
3.2.2.3	<i>Preparação da solução plasmidial para injeção .....</i>	<i>30</i>
3.2.2.4	<i>Execução da Técnica de eletroporação.....</i>	<i>30</i>
3.2.2.5	<i>Avaliação dos embriões após a eletroporação.....</i>	<i>31</i>
3.2.2.6	<i>Armazenamento dos embriões após a eletroporação.....</i>	<i>31</i>
3.3	ANÁLISE DOS EMBRIÕES.....	32
3.3.1	<b>Parâmetros para admissão de Morte embrionária .....</b>	<b>32</b>
3.3.2	<b>Parâmetros para admissão de Malformações embrionárias .....</b>	<b>32</b>
3.3.3	<b>Identificação de falsos positivos para marcações de EGFP em embriões de <i>G. Gallus</i>.....</b>	<b>33</b>
3.3.4	<b>Parâmetro para regionalização das marcações de EGFP na CN.....</b>	<b>34</b>
3.3.5	<b>Normalização dos dados morfológicos.....</b>	<b>35</b>
3.3.6	<b>Análises estatísticas realizadas neste trabalho .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>



4.1	AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE DNA CIRCULAR PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORECENTE VERDE APRIMORADA .....	36
4.1.1	Transfecção, ampliação e purificação do DNA plasmidial .....	37
4.1.2	Teste de integridade do plasmídeo em gel de eletroforese .....	37
4.2	PADRONIZAÇÃO DA VOLTAGEM APLICADA NA ELETROPORAÇÃO .....	39
4.2.1	A eletroporação em embriões foi mais eficiente com 12V .....	39
4.2.2	A taxa de mortalidade embrionária cresce em função do aumento da voltagem na eletroporação .....	40
4.2.3	Eletroporação com voltagens mais altas gera maior taxa de malformações (%).....	41
4.3	AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE EGFP EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> .....	42
4.3.1	Embriões eletroporados com 12V e 15V geraram marcações mais intensas e homogêneas .....	43
4.3.2	A expressão do plasmídeo CAGGS-EGFP persiste pelo menos 72h após eletroporação.....	44
4.3.3	O domínio da Crista Neural Cefálica foi marcado através do protocolo de eletroporação aplicado .....	46
4.4	PROTOCOLO OTIMIZADO DA TÉCNICA DE ELETROPORAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNC EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS IN OVO</i> .....	48
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	54
7	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

Entender como um pequeno grupo de células aparentemente iguais, formadas após a fecundação, conseguem coordenar o complexo processo de diferenciação celular gerando um novo indivíduo completo, é um dos mais fascinantes desafios da biologia. A habilidade de bloquear e/ou estimular a síntese de proteínas específicas, durante o desenvolvimento embrionário, desencadeou uma grande revolução no conhecimento sobre os mecanismos que coordenam a diferenciação celular. O conhecimento crescente nas diversas áreas da biologia molecular e biologia celular serviu como alicerce para tal revolução. Existe, no entanto, um outro campo de conhecimento que foi igualmente importante para essa revolução científica, o estudo de mecanismos e técnicas que permitiram que sequências de DNA recombinantes, RNAs e outras moléculas biologicamente significativas fossem incorporados às células, dentre elas a eletroporação.

### 1.1 A TÉCNICA DE ELETROPORAÇÃO

A técnica de eletroporação, também conhecida por “eletropermeabilização” e “eletrotransfecção”, consiste na permeabilidade elétrica temporária e reversível das membranas celulares através de um pulso elétrico breve (PRASANNA & PANDA, 1997). A abertura de poros na membrana plasmática permite a entrada de moléculas como, DNA, RNA e proteínas para o interior da célula. Quando o pulso é encerrado, a membrana celular sofre uma resselagem o que assegura a sobrevivência das células eletricamente estimuladas (PRASANNA & PANDA, 1997).

A técnica de eletroporação revolucionou a manipulação genética e a pesquisa em biologia molecular. Nas décadas de 1950 e 1960, estudos demonstraram que um campo elétrico poderia alterar o potencial de membranas (COLE, 1968 *apud* CHANG, 1991), e que a aplicação de um campo muito alto poderia induzir a morte celular em bactérias, leveduras, protoplastos e eritrócitos (SALE & HAMILTON, 1967 e 1968). Em 1972, Neumann e Rosenheck descobriram que impulsos elétricos eram capazes de regular a permeabilidade das membranas de vesículas de maneira transitória (NEUMANN & ROSENHECK, 1972). Nesse mesmo ano, Jackson, Symons e Berg produziram o primeiro DNA recombinante (JACKSON, SYMONS & BERG, 1972).

A construção da primeira bactéria geneticamente modificada veio pouco tempo depois, em 1973, com o trabalho de Cohen e colaboradores. Os pesquisadores construíram um DNA

plasmidial *in vitro* com a utilização de endonucleases e por fim inseriram a sequência em uma cepa de *Escherichia coli*, estabelecendo os primórdios da engenharia genética (COHEN, 1973). No ano seguinte, a ciência avançou para a construção do primeiro animal transgênico (JAENISCH & MINTZ, 1974).

Na década de 1980, alguns trabalhos contribuíram para o aprofundamento na compreensão dos achados anteriores. Zimmermann descreveu a utilização da eletroporação para introduzir o quimioterápico metotrexato em eritrócitos de camundongo (ZIMMERMANN; VIENKEN & PILWAT, 1980). Em 1982 com os trabalhos intitulados "Electric field mediated gene transfer" (WONG & NEUMANN, 1982) e "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields" (NEUMANN et al., 1982) os efeitos da eletroporação foram estudados em membranas celulares para permitir a absorção de um DNA plasmidial. Os autores investigaram a formação de poros reversíveis nas membranas celulares induzida por campos elétricos, consolidando assim a base teórica para a aplicação prática da eletroporação em células complexas.

A partir de 1990, a técnica de eletroporação foi bastante empregada para introduzir diferentes moléculas e muitos protocolos com variações da técnica foram construídos e otimizados desde então (NEUMANN, 1996; MURAMATSU *et al.*, 1997; MURAMATSU; NAKAMURA & PARK, 1998; MOMOSE *et al.*, 1999; NAKAMURA & FUNAHASHI, 2013; SIMOES-COSTA & BRONNER, 2016; LAGO *et al.*, 2023). Em 1991, Niwa e colaboradores desenvolveram um vetor eficiente, CAGGS, que passou a ser amplamente utilizado em combinação com sequências de genes repórteres (NIWA; YAMAMURA & MIYAZAKI, 1991). Cinco anos mais tarde, em 1996, pesquisadores aprimoraram a proteína GFP, derivada da espécie de água-viva *Aequorea victoria*, tornando-a até 35 vezes mais eficiente que outros genes repórteres (ZHANG; GURTU & KAIN, 1996). A combinação desse vetor com a proteína GFP aprimorada (EGFP) garantiu uma ótima forma de verificar a efetividade da eletroporação sem ter que matar as células, facilitando a sua utilização no estudo da biologia do desenvolvimento (YASUDA; MOMOSE & TAKAHASHI, 2000; SATO *et al.*, 2007; HATAKEYAMA & SHIMAMURA, 2009).

O refinamento dos parâmetros da eletroporação contribuiu para a eficácia e aplicação crescente da técnica nas áreas da biotecnologia, biologia molecular, terapia gênica, criação de modelos animais transgênicos, controle da expressão gênica, sinalização celular, engenharia de tecidos e desenvolvimento de novas terapias. A eletroporação tem também desempenhado um papel crucial no estudo da biologia do desenvolvimento, sendo uma ferramenta valiosa para a manipulação genética. A técnica já foi aplicada em estudos com diversas espécies, incluindo

ascídias (DI GREGORIO & LEVINE, 2002), peixes (INOUE *et al.*, 1990), camundongos (SHIMOGORI & OGAWA, 2008), *Drosophila* (ELLIS; DOMAGALA & CARON, 2023), *Xenopus* (CHERNET & LEVIN, 2012) e *Gallus gallus* (SUZUKI & OGURA, 2008).

## 1.2 ELETROPORAÇÃO EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS*

O primeiro trabalho que ilustrava a morfologia de *G. gallus* foi produzido ainda em 1889, por Duval (DUVAL, 1889). Em 1951 os pesquisadores Hamburger e Hamilton descreveram 46 estágios morfológicos (HH) distintos que são frequentemente utilizados por embriologistas para classificar os embriões (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

No modelo animal de *G. gallus*, a primeira eletroporação exitosa foi realizada com explantes de retina e publicada em 1990. Nos anos seguintes, a técnica foi empregada em embriões *in ovo* (MURAMATSU *et al.*, 1997; MURAMATSU; MIZUTANI & OKUMURA, 1996 *apud* SCAAL, *et al.*, 2004; MURAMATSU; NAKAMURA & PARK, 1998), e posteriormente aprimorada para restringir a marcação ao tecido alvo através de microeletrodos (MOMOSE, 1999). A sua combinação com outras técnicas como a de microdissecção do tubo neural (DOUARIN & TEILLET, 1973; MILLER *et al.*, 2018), marcações persistentes (SATO *et al.*, 2007) e *knockdown* com a utilização de morfolidos (SIMOES-COSTA & BRONNER, 2016) promoveu um campo fértil para o estudo da biologia do desenvolvimento.

A aplicação da eletroporação em embriões de *G. gallus* permitiu avanços significativos na compreensão de processos complexos. A condição ovípara da espécie, o rápido desenvolvimento dos embriões, a baixa manutenção exigida, somadas ao baixo custo e a fácil manipulação são algumas das características que favorecem a utilização desse modelo animal (RIBATTI & ANNESE, 2023; GARCIA *et al.*, 2021). Ao empregar a eletroporação em embriões de *G. gallus*, pesquisadores fizeram notáveis descobertas sobre a rede regulatória de genes que controla uma importante estrutura embrionária, a Crista Neural (CN) (CREUZET, *et al.*, 2004; SIMOES-COSTA & BRONNER, 2016; MILLER, *et al.*, 2018).

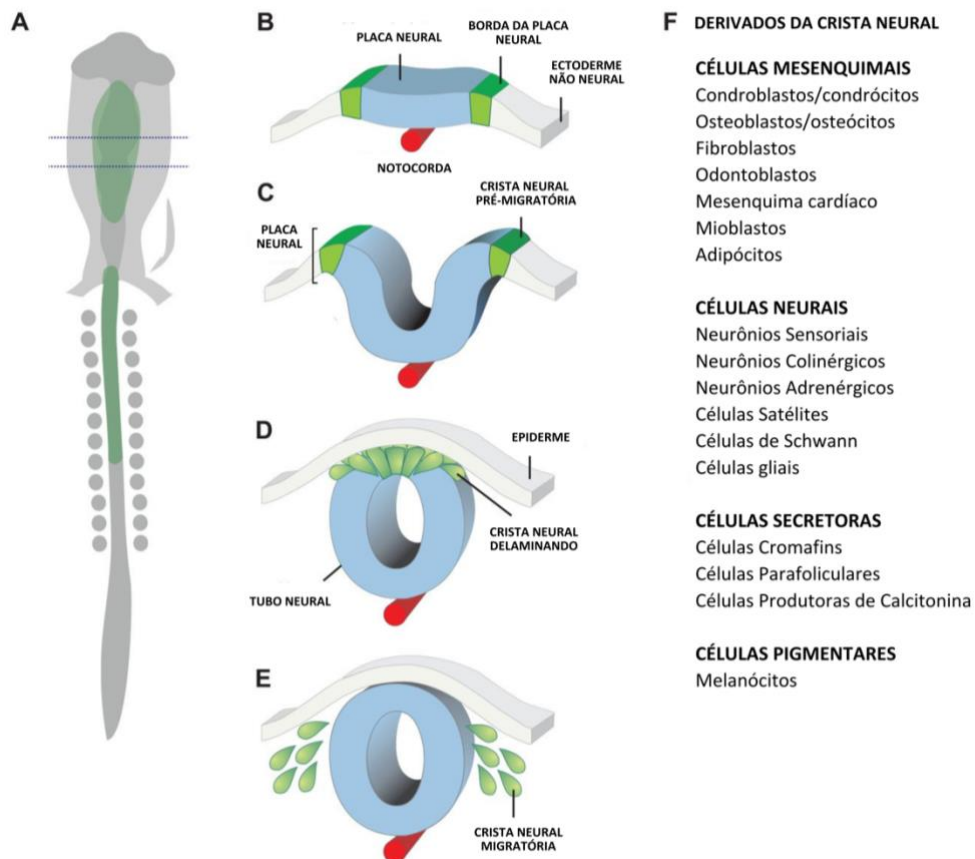
## 1.3 CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

A Crista Neural é uma população de células multipotentes que têm a sua origem nas bordas dorsais do neuroepitélio em fechamento, durante a neurulação (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Estas células passam por transição epitélio-mesenquimal (TEM), migram por diversas rotas e sob influência de componentes intrínsecos e variados componentes do

microambiente diferenciam para tipos celulares distintos, que abrangem, mas não se restringem, a células do sistema nervoso periférico (PNS), células pigmentares da pele, células secretoras e derivados mesenquimais que formam o esqueleto craniofacial (SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015; BRONNER-FRASER, 2018; DUPIN *et al.*, 2018) (FIGURA 1).

**Figura 1 – Disposição da Crista Neural ao longo do eixo anteroposterior, formação do tubo neural e das células da CN e fenótipos derivados da CN.**

(A) Visão dorsal esquemática de um embrião de galinha, mostrando a CN (verde) nas proximidades da linha média com uma separação entre CN Cefálica (CNC) na porção mais anterior do embrião e CN Truncal (CNT) na região posterior. As linhas pontilhadas delimitam a região embrionária representada em seção transversal (B-E). (B) especificação da borda da placa neural (verde) nas bordas da placa neural (azul) durante o estágio de gástrula. (C) À medida que a placa neural se aproxima para formar o tubo neural, os progenitores da CN são especificados na parte dorsal das dobras neurais. (D) Após a especificação, as células da CN passam por TEM e delaminam-se do tubo neural. (E) As células de CN migram por diferentes rotas até sofrerem diferenciação para diversos tipos celulares. (F) Derivados mesenquimais, neuronais, secretoras e pigmentares da CN.



Fonte: Adaptado de SIMÕES-COSTA & BRONNER, 2015

Fatores de transcrição, modificadores epigenéticos e moléculas sinalizadoras estão relacionados a uma complexa rede regulatória de genes que coordenam a especificação,

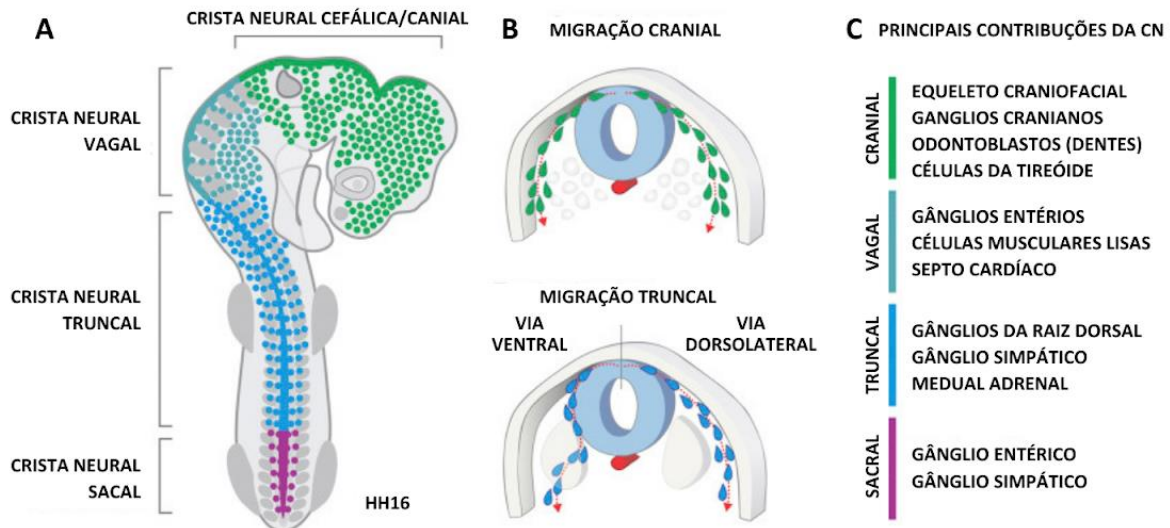
delaminação, migração e diferenciação das células da CN (CCN) (MARTIK *et al.*, 2019; HU; STROBL-MAZZULLA & BRONNER, 2014). Essa população de células apresenta uma segmentação ao longo do eixo anteroposterior que permite a definição dos domínios, também chamados de subpopulações da CN, são eles: cefálico, vagal, truncal e sacral (ROTHSTEIN; BHATTACHARYA & SIMOES-COSTA, 2018) (FIGURA 2). Apesar de possuir um circuito genético compartilhado entre toda a população, cada domínio exibe uma expressão própria que o caracteriza e que permite a diferenciação celular específica de cada região (SIMÕES-COSTA & BRONNER, 2015; ROTHSTEIN; BHATTACHARYA & SIMOES-COSTA, 2018), FIGURA 2.

As CCN de diferentes subpopulações migram por variadas rotas, diferenciando sob a influência do microambiente e dando origem a fenótipos celulares distintos. A multipotencialidade das células da CN tem sido alvo de intensa pesquisa que busca compreender e identificar os fatores intrínsecos e extrínsecos e os mecanismos moleculares que contribuem para o processo de diferenciação das células da CN (ROTHSTEIN & SIMÕES-COSTA, 2023; SIMÕES-COSTA & BRONNER, 2016; CALLONI, *et all.*, 2007) (FIGURA 2).

A CN está presente em muitas estruturas embrionárias e é postulada como um grande passo na evolução no grupo dos craniatas, devido a sua contribuição para estruturas que possibilitaram o hábito de vida predatória (GANS & NORTH CUTT, 1983). Além disso, a própria mandíbula e a maioria dos ossos e cartilagens da cabeça são derivadas dela (FIGURA 2 e 3).

**Figura 2 – Domínios da CN ao longo do eixo anteroposterior, rotas de migração e células e estruturas derivadas da CN.**

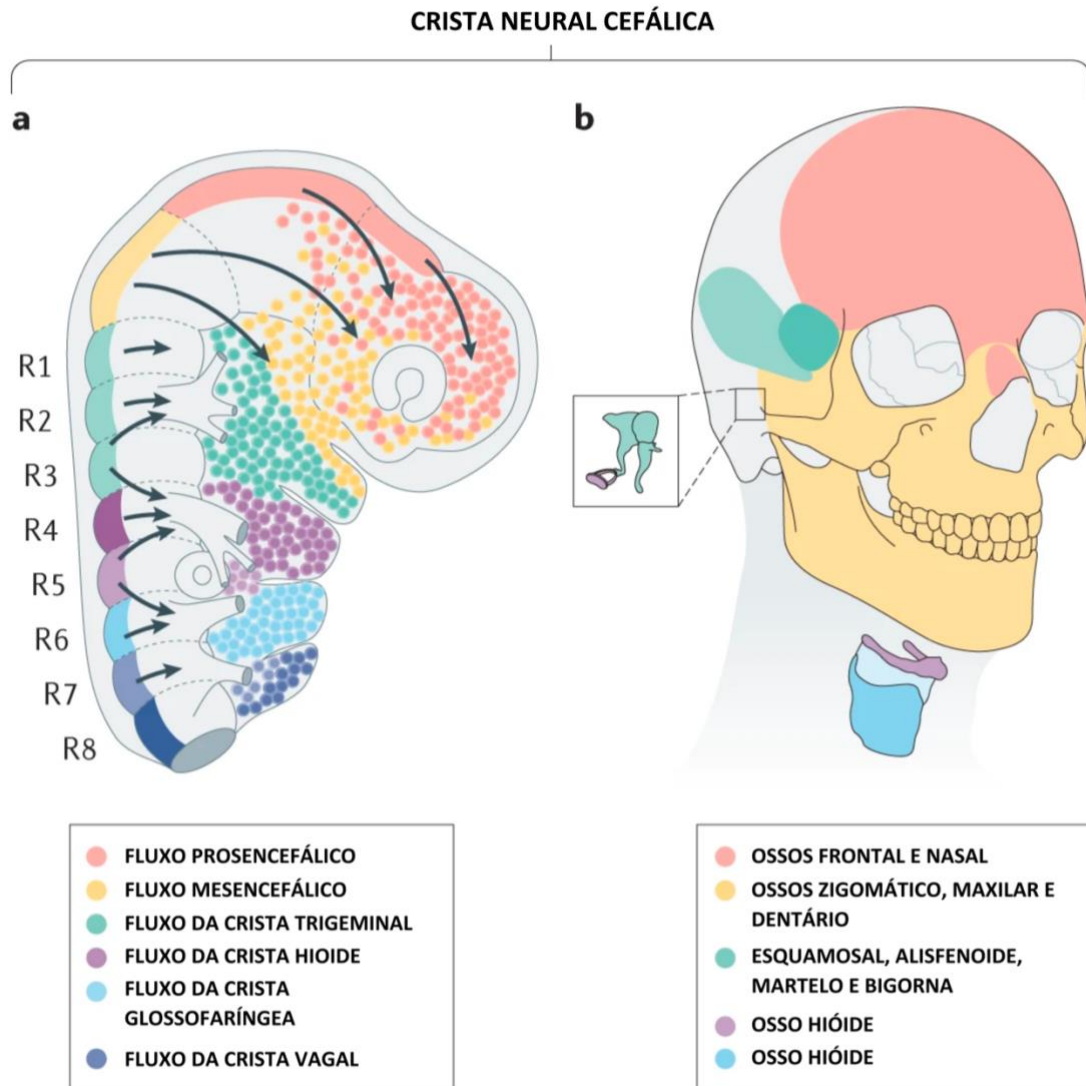
(A) Visão geral dos domínios da Crista Neural e seu destino de migração ao longo do eixo anteroposterior em um embrião de galinha HH16. (B) Demonstra as diferenças nos padrões migratórios entre os domínios da CN. A CNC migra dorsolateralmente, a CNT, pode seguir a via de migração dorsolateral ou ventral. (C) Destaca os principais derivados dos domínios



Fonte: adaptado de ROTHSTEIN; BHATTACHARYA & SIMÕES-COSTA, 2018.

**Figura 3 – Rotas de migração e estruturas craniofaciais derivadas da Crista Neural.**

(A) Apresenta os fluxos migratórios da CN da região encefálica (setas). Regiões encefálicas no sentido anteroposterior, respectivamente: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. As distintas vias migratórias da CN são codificadas por cores para correspondentes aos derivados do esqueleto craniofacial que dão origem no adulto humano (parte b). R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8 são os rombômeros (segmentações do rombencéfalo).



Fonte: adaptado de MARTIK & BRONNER, 2021.

Desde sua descoberta em 1868 por His (HIS, 1868), a CN atrai a atenção de muitos cientistas devido a suas propriedades únicas. Os principais avanços no estudo das CCN ocorreram a partir da segunda metade do século XX, impulsionados pelos experimentos envolvendo quimeras de galinha-codorna, realizados pelo grupo da pesquisadora Nicole Le Douarin, que foram essenciais na compreensão das vias migratórias e dos derivados da CN (LE DOUARIN, 1969 e 1973; LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Mais tarde, outros estudos aprofundaram o conhecimento acerca das potencialidades e regulação gênica das CCN (AGUIAR, 2012; DUPIN *et al.*, 2018; CALLONI *et al.*, 2007; MARABLE & BRONNER, 2023), demonstrando assim sua importância para o desenvolvimento dos vertebrados.



A compreensão aprofundada da rede regulatória de genes que coordena a população de CCN é essencial para traçar a evolução dos vertebrados ao longo do tempo e para elucidar os mecanismos moleculares e genéticos subjacentes ao desenvolvimento normal e patológico (MARTIK *et al.*, 2019; BRUET *et al.*, 2023). A CN possui também uma grande relevância clínica, uma vez que, ao contribuir com a formação de variados tipos celulares, alterações na sua regulação ou de seus derivados refletem em anomalias em uma grande variedade de estruturas, desde a pele (DIENER & SOMMER, 2021), o sistema nervoso periférico (BHATHEJA & FIELD, 2006), ao craniofacial (BENEVENUTTI, 2022), causando muitas síndromes e distúrbios no neurodesenvolvimento (BRUET *et al.*, 2023).

A CN se origina do neuroepitélio, mas migra muito cedo, logo, a sua manipulação necessita ser feita em uma janela de tempo muito pequena, de forma que essa população de células já tenha sido determinada, mas ainda não tenha migrado. Nesse contexto, a otimização da técnica de eletroporação é uma ferramenta eficaz para introduzir moléculas em CCN de forma localizada, permitindo a manipulação genética precisa para estudar os mecanismos de desenvolvimento e as interações moleculares. A capacidade de otimizar essa técnica não apenas facilita a realização de experimentos mais refinados, de ganho e perda de função por exemplo, mas também abre caminho para descobertas inovadoras e avanços substanciais no entendimento da CN e suas implicações médicas e evolutivas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Padronizar um protocolo para a execução otimizada da técnica de eletroporação *in vivo* em embriões de *Gallus gallus domesticus*, com enfoque nas células da Crista Neural.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar a produção e a utilização do plasmídeo pCAGGS-EGFP na eletroporação em embriões de *G. gallus*;
- Relacionar a efetividade do protocolo de eletroporação em embriões de *G. gallus* com a aplicação de diferentes voltagens;
- Avaliar a taxa de sobrevivência dos embriões de *G. gallus* após eletroporação com diferentes voltagens;

- Verificar o efeito da eletroporação com diferentes voltagens sobre a taxa de malformações em embriões de *G. gallus*;
- Analisar a localização anatômica das marcações para EGFP geradas através do protocolo de eletroporação executado;
- Investigar a persistência da expressão de EGFP, após a eletroporação, por pelo menos 72h;
- Selecionar, dentre os parâmetros testados, os mais indicados para se obter eletroporação das células da Crista Neural Cefálica.

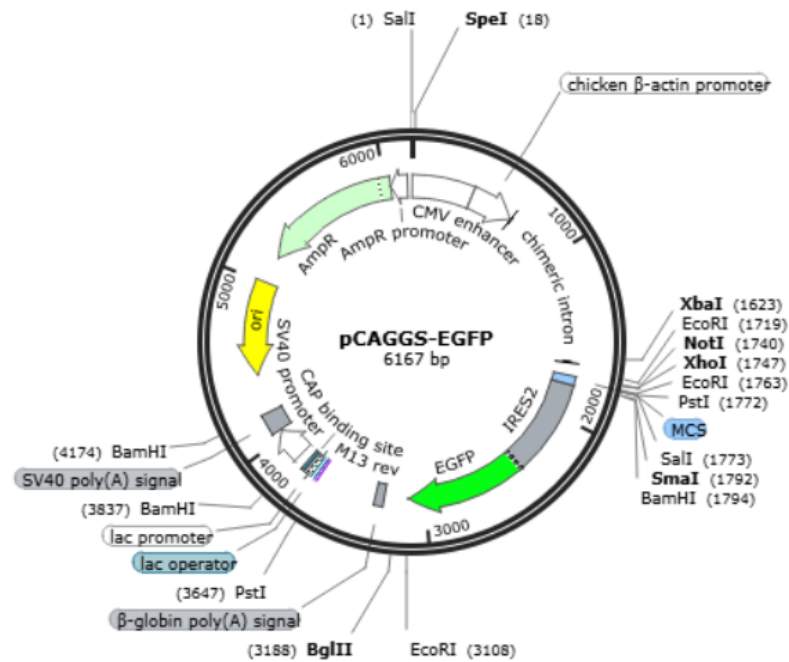
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO QUE PERMITA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EGFP EM CÉLULAS DE *G. GALLUS*

Para validar a eficiência da técnica de eletroporação foi selecionado o plasmídeo pCAGGS-EGFP (Niwa *et al.*, 1991). Esta molécula é um DNA circular com a combinação de um intensificador de expressão para citomegalovírus humano (CMV - *enhancer*), um promotor de  $\beta$ -actina de galinha, um gene de resistência a Ampicilina (AmpR) e uma sequência que codifica a Proteína Verde Fluorescente Aprimorada (EGFP) (ZHANG; GURTU & KAIN, 1996) (FIGURA 2). Uma vez o plasmídeo introduzido nas células do hospedeiro (animal), o promotor de  $\beta$ -actina é ativado e a célula passa a expressar a proteína EGFP que gera uma marcação que pode ser visualizada em lupa ou microscópio de fluorescência após um intervalo de transfecção de 16-24h (FIGURA 4).

#### **Figura 4 – Estrutura Plasmidial.**

Estrutura esquemática completa do plasmídeo CAGGS-EGFP, mostrando as regiões com o intensificador de expressão para citomegalovírus humano (CMV - *enhancer*), promotor de  $\beta$ -actina de galinha, gene de resistência a Ampicilina (AmpR) e uma sequência que codifica a Proteína Verde Fluorescente Aprimorada (EGFP).



Fonte: Empresa comercial Life Science Market

### 3.1.1 Transfecção de bactéria com plasmídeo CAGGS-EGFP

A produção deste plasmídeo deu-se por meio de um protocolo de transfecção de bactérias quimiocompetentes realizado em sala de Nível de Biossegurança 2 para Organismos Geneticamente Modificados (NB2/OGM), a qual foi certificada pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da UFSC (CQD101/99). Utilizou-se a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , uma cepa altamente eficiente. O protocolo consiste na transfecção, seleção e crescimento das bactérias. No primeiro passo, as bactérias já em um tubo contendo o pCAGGS-EGFP (1 ug/ul), foram submetidas a uma incubação no gelo por 30 minutos, em seguida foram incubadas por 40 segundos a 42°C e depois retornaram para o gelo por mais 2 minutos. Posteriormente, 1 ml do meio LB (Bacto-tryptone, Bacto-Yeast Extract, NaCl e água ultrapura Milli-Q) sem ampicilina foi adicionado no tubo e as bactérias foram incubadas por 45 minutos a 37°C. Depois desse período de crescimento, parte dessas bactérias foram plaqueadas em ágar diluído em meio LB com ampicilina em uma concentração de 100 ug/ml após sua gelificação e deixadas *overnight* incubando em uma estufa bacteriológica a 37°C.

No dia seguinte as colônias bacterianas menores, mais bem delimitadas e afastadas das demais foram selecionadas e transferidas para tubos com 5ml de meio LB com ampicilina [100 ug/ml]. Os tubos foram colocados em agitador por 8 horas sob agitação de 165 rpm, a 37°C. A tampa do tubo foi mantida semiaberta para que o ar pudesse entrar e as bactérias pudessem

crescer. Essa etapa é denominada cultura de contraprova. Foi realizada para testar a resistência à ampicilina das colônias selecionadas.

Após 8h de cultivo, o tubo com o meio mais turvo foi selecionado e 200 µl do seu conteúdo foi posto em um Erlenmeyer com 100ml de meio LB com ampicilina [100 µg/ml]. O Erlenmeyer ficou *overnight*, de 12 a 16 horas no agitador sob agitação (165 rpm) a 37°C para que as bactérias que fossem resistentes pudessem crescer. Essa etapa é denominada cultura grande.

No dia seguinte, após o crescimento exponencial das bactérias no meio, o conteúdo do Erlenmeyer foi dividido em dois tubos de 50ml e centrifugado a 6.000g por 30 minutos a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado deixando apenas um concentrado/*pellet* no fundo do tubo. Este concentrado foi armazenado no freezer -20°C.

### **3.1.2 Extração do plasmídeo CAGGS-EGFP**

Para extração e purificação de plasmídeo de bactérias, foi utilizado o kit QIAGEN Plasmid Midi (Cat.12145). Por meio do kit, o plasmídeo foi separado de todo o restante do conteúdo do caldo de cultivo das bactérias. A extração foi realizada conforme orientações do fabricante. Resumidamente, na primeira etapa ressuspendeu-se o concentrado de bactérias resultante da etapa de transfecção com 4 ml da solução P1 do kit. Na sequência, adicionou-se 4 ml da solução P2 que promove a lise das células. Após homogeneizar por inversão do tubo, deixou-se agir por 5 minutos. Foi então adicionado ao tubo 4 ml da solução tampão P3, já previamente refrigerada. A solução foi também homogeneizada por inversão e logo depois foi realizada uma incubação de 15 minutos no gelo. Posteriormente a solução foi centrifugada a 9.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 ml e uma segunda centrifugação nas mesmas condições foi realizada. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para mini colunas que foram anteriormente impregnadas com a solução QBT. Por gravidade o líquido passou pelas mini colunas. Em seguida as colunas foram lavadas duas vezes com 10 ml da solução tampão QC. Uma segunda solução tampão, QF, foi aquecida a 65°C e 5 ml foram utilizados para lavar as mini colunas. A solução fluiu para um novo tubo de 15ml para coleta do DNA. No novo tubo, foi adicionado 3,5 ml de álcool isopropílico 100% PA para promover a precipitação do DNA plasmidial. O material foi incubado *overnight* no freezer -20°C. No dia seguinte uma terceira centrifugação ocorreu a 9.000g e 4°C por de 1 hora. O sobrenadante foi removido e um concentrado/*pellet* foi observado no fundo do tubo. O concentrado foi lavado cuidadosamente com 2 ml de etanol 70% e centrifugado a 9.000g por

30 minutos a 4°C. O etanol foi removido e o material secou por evaporação por 5-10 minutos, por fim o DNA plasmidial foi solubilizado em 64ul de água livre de nucleases, em seguida foi dosado, usando um Espectrofotômetro NanoVue e, enfim, armazenado no freezer a -20°C.

### 3.1.3 Avaliação da integridade do plasmídeo CAGGS-EGFP

Para verificar a integridade do plasmídeo, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose. Essa técnica possibilita uma série de análises e consiste na separação de moléculas de acordo com seu peso molecular, tamanho e carga elétrica. A separação se dá através de um gel imerso em meio líquido e sob aplicação de um campo elétrico. Para confirmar a presença e integridade do plasmídeo EGFP o seguinte protocolo de eletroforese foi executado: preparou-se um gel de agarose 1% diluído na solução tampão de Tris EDTA 1x (TAE 1x (Tris - 40mM; EDTA - 1mM; Ácido Acético (20mM))). Após esperar o gel gelificar, o mesmo foi posicionado dentro da cuba de eletroforese com os poços voltados para o polo negativo do equipamento de eletroforese. A cuba foi preenchida com a solução tampão TAE 1x até cobrir todo o gel. Em seguida as amostras foram aplicadas nos poços conforme a tabela 1. Após a pipetagem, a cuba de eletroforese foi programada para 500A e 50V e ligada com o polo positivo posicionado contrário à disposição das amostras para que a carga negativa do material genético fosse atraída para o polo positivo. A título de comparação, 4 poços do gel de agarose foram preenchidos, dois deles com diluições do conteúdo resultante da extração plasmidial e outros dois com diluições do plasmídeo de SIX2 já previamente conhecido no laboratório. Para visualização das amostras, utilizou-se um intercalante de ácidos nucleicos, o Blue Green, que emite fluorescência quando exposto a faixa de luz UV. A visualização foi realizada com um Transluminador UVP MultiDoc-It™ Imaging Systems.

**Tabela 1 – Distribuição das amostras nos poços do gel de agarose 1%.**

	Poço 1 – SIX2	Poço 2 – EGFP	Poço 3 – SIX2	Poço 4 – EGFP
DNA	1,5ul	1,5ul	4,5ul	4,5ul
<i>Blue Green</i>	1ul	1ul	1ul	1ul
Água Nuclease Free	3,5ul	3,5ul	0,5ul	0,5ul

Fonte: elaborado pela autora

### 3.1.4 Dosagem do plasmídeo

A dosagem do plasmídeo obtido foi realizada com um espectrofotômetro, modelo NanoVue. Para dosar foram utilizados 2ul da solução plasmidial em duplicata.

### 3.2 ELETROPORAÇÃO

A técnica de eletroporação utilizada neste trabalho foi uma adaptação de alguns protocolos previamente estabelecidos e utilizados por outros grupos de pesquisa (FUNAHASHI *et al.*, 1999; CREUZET *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2012; MARABLE & BRONNER, 2023; ODANI; HOU & NAKAMURA, 2009; SUZUKI & OGURA, 2008). Embriões de *Gallus gallus domesticus*, com 5 a 10 somitos, serviram de modelo animal e foram usados conforme o passo a passo descrito a seguir. Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de embriões de *G. gallus* foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo 6016021017).

#### 3.2.1 Materiais

**Tabela 2 – Lista de materiais utilizados na eletroporação**

<b>Material</b>	<b>Especificação ou observação</b>
Eletroporador	Eletroporator Power Supply - Caltech Bio-Electronics shop
Incubadora para ovos	Chocadeira elétrica automática ChocMais
Lupa	Olympus SZ61
Microscópio	Estereoscópico Olympus SZX2-ILLB de epifluorescencia
Solução Plasmidial	pCAGGS-EGFP
Ovos fecundados	
PBS 1X	
Suporte para ovos	
Descarte	
Tesoura e/ou Pascheff-Wolff	
Pinça	

Fita atóxica	
Mangueira sorológica	
Capilares de vidro	
Ponteiras	
Corante Fast Green	
Pipeta Pasteur	
Placa de petri	
Pipeta	
Formol 4%	
Computador	
Tubo de ensaio plástico	

Fonte: elaborado pela autora

### 3.2.2 Passo a passo para execução do protocolo de eletroporação

#### 3.2.2.1 Obtenção e preparação dos embriões para a eletroporação

Os ovos de *G. gallus* utilizados neste trabalho foram adquiridos através de doações feitas pelo professor Fabiano Dahlke, do Laboratório de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que prontamente disponibilizou sua equipe para separar e fazer o transporte adequado dos ovos até nosso laboratório. Após a entrega, os ovos foram mantidos a 18°C até que fossem incubados a 38°C, com 80% de unidade em uma chocadeira elétrica automática ChocMais, de 30 a 32h até atingirem a idade embrionária desejada (HH 8 - 10, com 5 a 10 somitos).

#### 3.2.2.2 Configuração do Eletroporador

O eletroporador foi configurado para emissão de onda quadrada com crista de 30ms e vale de 100ms; 5 pulsos. A voltagem aplicada na eletroporação foi única para cada grupo experimental (3V, 6V, 9V, 12V ou 15V). Durante a aplicação da técnica o equipamento foi

acionado apenas uma vez para cada embrião. A amperagem é ajustada automaticamente pelo equipamento.

### 3.2.2.3 Preparação da solução plasmidial para injeção

O plasmídeo CAGGS-EGFP foi misturado com o corante vital, Fast Green, e em seguida aspirado para dentro de um capilar de vidro afinado em fogo, para facilitar a injeção no tubo neural. A coloração adicionada ao plasmídeo facilita a visualização durante a sua aplicação.

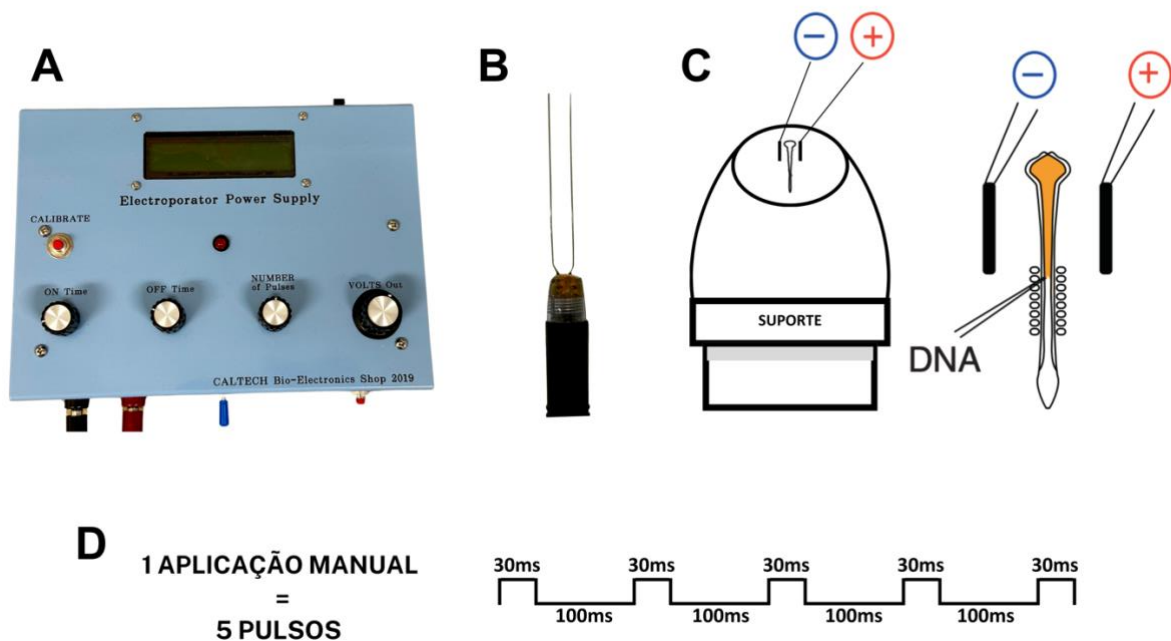
### 3.2.2.4 Execução da Técnica de eletroporação

Com a bancada organizada e otimizada para a execução da técnica, os ovos foram posicionados na lupa Olympus SZ61. Uma abertura foi feita na casca do ovo para que o embrião pudesse ser acessado. Com o auxílio de um capilar com a ponta cortante, a membrana amniótica foi removida de cima do embrião e com uma pipeta Pasteur de 2 a 3 gotas de PBS 1x foram adicionadas para manter a umidade superficial do embrião e criar um meio permissivo para a formação de um campo elétrico. Com uma mangueira sorológica adaptada com um capilar de ponta modificada em uma das pontas e uma ponteira com filtro encaixada na outra, a solução plasmidial foi injetada por pipetagem bucal no lúmen do tubo neural na região cefálica dos embriões. Imediatamente os eletrodos foram posicionados nas laterais da região cefálica do embrião, sempre com o lado negativo na esquerda e o lado positivo na direita, e então o eletroporador foi acionado apenas uma vez (FIGURA 5). Após o procedimento, os ovos foram fechados com o auxílio de uma fita adesiva atóxica e retornaram para a incubadora.

### **Figura 5 - Esquema da disposição dos eletrodos durante execução da eletroporação *in ovo* e detalhes da onda quadrada.**

(A) Eletroporador Power Supply - Caltech Bio-Electronics shop. (B) eletrodos. (C) desenho esquemático da eletroporação *in ovo*. Em laranja destaca-se a representação do DNA plasmidial no lúmen do tubo neural. (D) exemplificação de uma onda quadrada com 5 cristas de 30ms intercaladas com 4 vales de 100ms.





Fonte: (A, B e D) elaborado pela autora. (C) adaptado de ITASAKI; BEL-VIALAR & KRUMLAUF, 1999.

### 3.2.2.5 Avaliação dos embriões após a eletroporação

Para avaliar a efetividade da técnica aguardou-se um intervalo de 24h. Passado este tempo, os ovos foram retirados da incubadora e mantidos por 30 minutos na geladeira para que o desenvolvimento de todos parasse ao mesmo tempo. A fita que estava vedando o orifício no ovo foi removida com o auxílio de uma tesoura, 2-3 gotas de PBS 1x foram pipetadas sobre o embrião e este foi então posicionado na lupa para confirmação da sobrevivência embrionária ainda no ovo. Em seguida, com o auxílio de pinças, tesoura do tipo Pascheff-Wolff e uma mini escumadeira, o embrião foi isolado e posto em uma placa de Petri com PBS 1x suficiente para cobri-lo, em seguida as membranas embrionárias que envolvem o embrião foram removidas e este foi posicionado no microscópio estereoscópico para visualização e registro fotográfico.

### 3.2.2.6 Armazenamento dos embriões após a eletroporação

Após os registros, os embriões foram fixados em formol 4% e armazenados em tubos de ensaio de plástico e deixados a 4°C abrigados de luz. Esse armazenamento possibilita que outras técnicas sejam aplicadas posteriormente.

### 3.3 ANÁLISE DOS EMBRIÕES

#### 3.3.1 Parâmetros para admissão de Morte embrionária

A primeira análise realizada foi a de morte embrionária baseada na verificação de sinais vitais no embrião. Esta análise ocorre em seguida da abertura do ovo após a segunda incubação. O principal indicativo de morte embrionária é a ausência de batimentos cardíacos. No estágio embrionário HH 17, a cabeça do embrião já sofreu curvatura e seu coração é bem visível, o que facilita o diagnóstico. O sangue circula entre o corpo do embrião, sendo bem evidente o halo de novos vasos formados sobre a gema à sua volta. A morte embrionária foi admitida na ausência de batimentos cardíacos e fluxo sanguíneo. Grupos amostrais com alta incidência de mortes devida à baixa viabilidade e qualidade natural dos ovos foram desconsiderados desta análise, essa informação foi balizada com outros membros do laboratório.

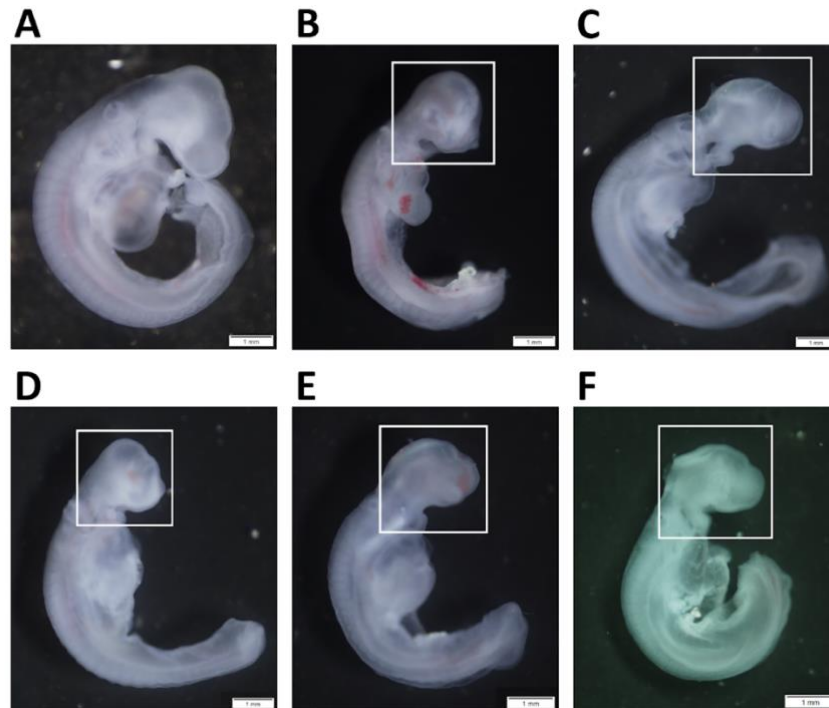
#### 3.3.2 Parâmetros para admissão de Malformações embrionárias

Nas análises de malformações desconsiderou-se pequenos atrasos no desenvolvimento, devido a variações naturais que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. Foi considerado apenas malformações evidentes na morfologia embrionária (FIGURA 6). O padrão de morfogênese considerado durante esta análise foi o estabelecido por Hamburger e Hamilton em 1951. Os embriões foram avaliados para malformações independente de apresentarem morte precoce ou não. Grupos amostrais com alta incidência de malformações devida à baixa viabilidade e qualidade natural dos ovos foram desconsiderados desta análise, essa informação foi balizada com outros membros do laboratório.

**Figura 6 – Alterações morfológicas consideradas malformações durante o estudo.**

A - Embrião HH 17 (29 a 32 pares de somitos) sem malformação. B, C, D, E e F exemplificam condições morfológicas que foram consideradas malformações durante as análises. As caixas em branco destacam as regiões nas quais foram constatadas malformações craniofaciais, como alterações na morfologia da cabeça, desproporção do tamanho da cabeça do embrião em relação ao estágio embrionário (HH 17), deformações na estrutura das

vesículas encefálicas, comprometimento no desenvolvimento do processo frontonasal, malformações do primeiro arco branquial e alterações na morfologia da vesícula óptica.



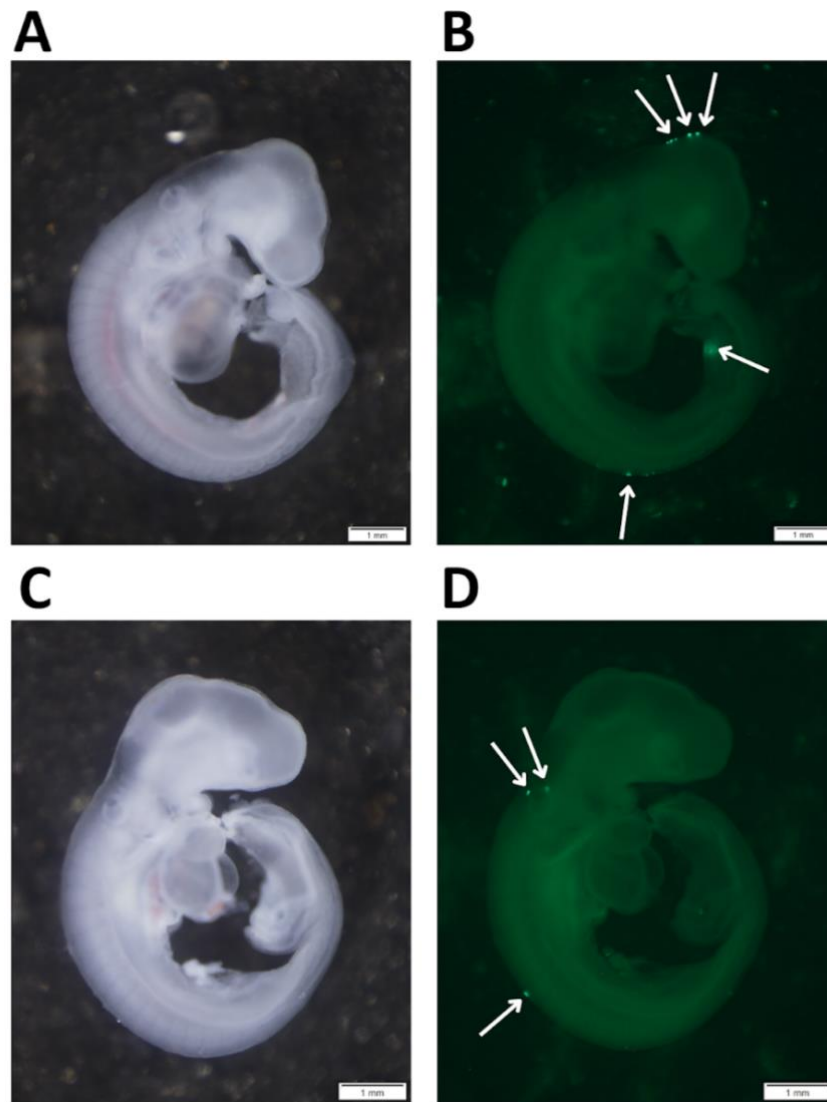
Fonte: elaborado pela autora

### 3.3.3 Identificação de falsos positivos para marcações de EGFP em embriões de *G. Gallus*

Nas avaliações das marcações do plasmídeo pCAGGS-EGFP, ocasionalmente pequenos pontos isolados emitiram fluorescência no embrião, contudo considerou-se que estes pontos não são suficientes para serem classificados como marcação positiva uma vez que a sua interferência no sistema como um todo seria muito limitada. Por isso, estabeleceu-se qualitativamente o que não foi considerado uma marcação positiva (FIGURA 7).

#### **Figura 7 – Identificação de marcações para EGFP falsas positivas.**

A primeira coluna (A e C) apresenta embriões HH 17 (de 29 a 32 pares de somitos) em vista lateral em campo claro. A segunda coluna (B e D) apresenta os respectivos embriões sob luz UV, destacando nas pontas das setas em branco os pontos isolados de marcação do plasmídeo EGFP.



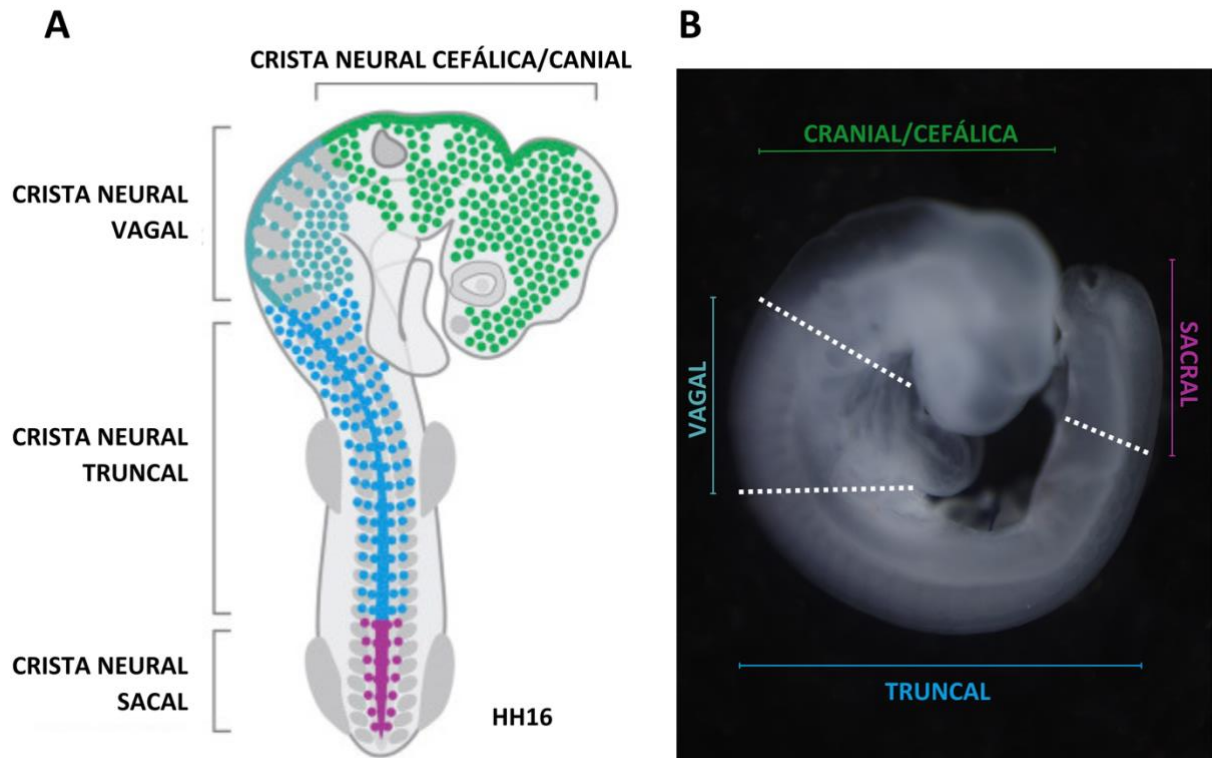
Fonte: elaborado pela autora

### 3.3.4 Parâmetro para regionalização das marcações de EGFP na CN

A posição das marcações de EGFP foram avaliadas nos grupos tratados com 9V, 12V e 15V, devido a eficiência da técnica nesses grupos. As marcações foram divididas em secções tendo como parâmetro de divisão os domínios da CN, Crista Neural Cefálica (CNC), Crista Neural Vagal (CNV), Crista Neural Truncal (CNT) e Crista Neural Sacral (CNS) (FIGURA 8).

#### **Figura 8 – Esquema de regionalização para marcações na Crista Neural.**

**A** indica os domínios da Crista Neural e o destino de migração das células conforme esquema de cores (55). **B** evidencia a mesma divisão em um embrião HH 17. As linhas pontilhadas marcam a divisão entre um domínio e outro. No sentido anteroposterior, a primeira linha pontilhada separa o domínio da CNC com a CNV, a segunda linha separa o domínios da CNV com a CNT e a terceira linha separa o domínio da CNT da CNS.



Fonte: (A) adaptado de ROTHSTEIN; BHATTACHARYA & SIMÕES-COSTA, 2018.  
(B) elaborado pela autora.

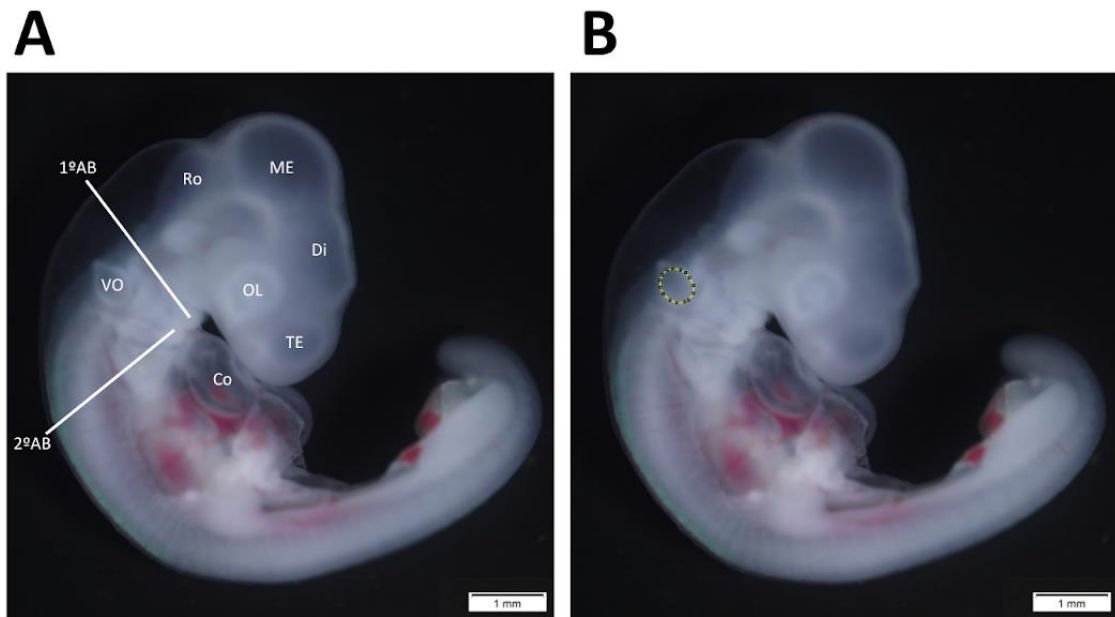
### 3.3.5 Normalização dos dados morfológicos

Naturalmente, existe uma grande variação no tamanho dos embriões, e para aumentar a precisão das análises, as marcações de EGFP obtidas foram normalizadas pela medida da vesícula ótica (VO), uma vez que esta é uma estrutura de fácil visualização e que já foi validada como estrutura normalizadora em outros trabalhos (BENEVENUTTI, 2022; CRUZ *et al.*, 2023, SOUZA *et al.*, 2023; TAUFER *et al.*, 2023). A circunferência foi medida através do programa ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND & ELICEIRI, 2012) conforme exemplificado na FIGURA 9. Os respectivos valores foram utilizados na normalização dos valores da contagem de Pixels da marcação.

#### Figura 9 – Medidas da Vesícula Ótica.

A e B correspondem ao mesmo embrião em HH 17 (29 a 32 pares de somitos), com vista lateral em campo claro. Em A pode-se observar algumas das principais estruturas do embrião: Olho (Ol), telencéfalo (TE), diencéfalo (Di), mesencéfalo (ME), rombencéfalo (Ro), Vesícula

ótica (VO), 1º arco branquial (1ºAB), 2º arco branquial (2ºAB) e coração (Co). **B** exemplifica a medição da circunferência da VO.



Fonte: elaborado pela autora

### 3.3.6 Análises estatísticas realizadas neste trabalho

Neste trabalho a análise descritiva dos dados obtidos, o teste de normalidade das amostras (Shapiro-Wilk e o de Kolmogorov-Smirnov), ANOVA para dados não-paramétricos (Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas), teste de correlação de postos de Spearman foram gerados no GraphPad Prism 10. Para todos os testes foi levado em consideração um valor de p (nível de significância) menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). O cálculo do Coeficiente de Dispersão Quartil (CDQ) foi feito através do Microsoft Excel.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE DNA CIRCULAR PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORECENTE VERDE APRIMORADA

Para amplificar a sequência de DNA contendo as informações necessárias para a expressão da proteína EGFP, foi utilizada a técnica de transfecção bacteriana. De forma resumida, o DNA de interesse foi introduzido numa linhagem de bactérias (transfecção) que,

ao proliferarem, amplificam a sequência de DNA de interesse, em seguida essa sequência foi purificada e eletroporada em embriões (para detalhes ver tópico 3 - Material e Métodos).

#### **4.1.1 Transfecção, ampliação e purificação do DNA plasmidial**

A transfecção de bactérias *E. coli* foi realizada utilizando a concentração de 1ug/ul de plasmídeo. Logo no primeiro teste (FIGURA 10A), foram obtidos um número razoável de colônias resistentes (mais de 20 colônias por placa) (FIGURA 10B). Dessas colônias (cada colônia é derivada de uma única célula), foram selecionadas quatro para a realização da cultura de contraprova (cultivo em meio líquido com antibiótico) (FIGURA 10C). Todas as colônias cresceram bem, isso indica que na primeira etapa (seleção em ágar) todos os clones que cresceram e foram selecionados eram realmente resistentes à ampicilina. Nessa etapa, o tubo que apresentou a maior turbidez foi selecionado para cultivo em grande volume (FIGURA 10D e 10E). A turbidez do meio de cultivo, nesse contexto, é um indicativo do número de bactérias, ou seja, quanto maior a turbidez, maior o número de bactérias que conseguiram sobreviver ao período de cultivo na presença do antibiótico.

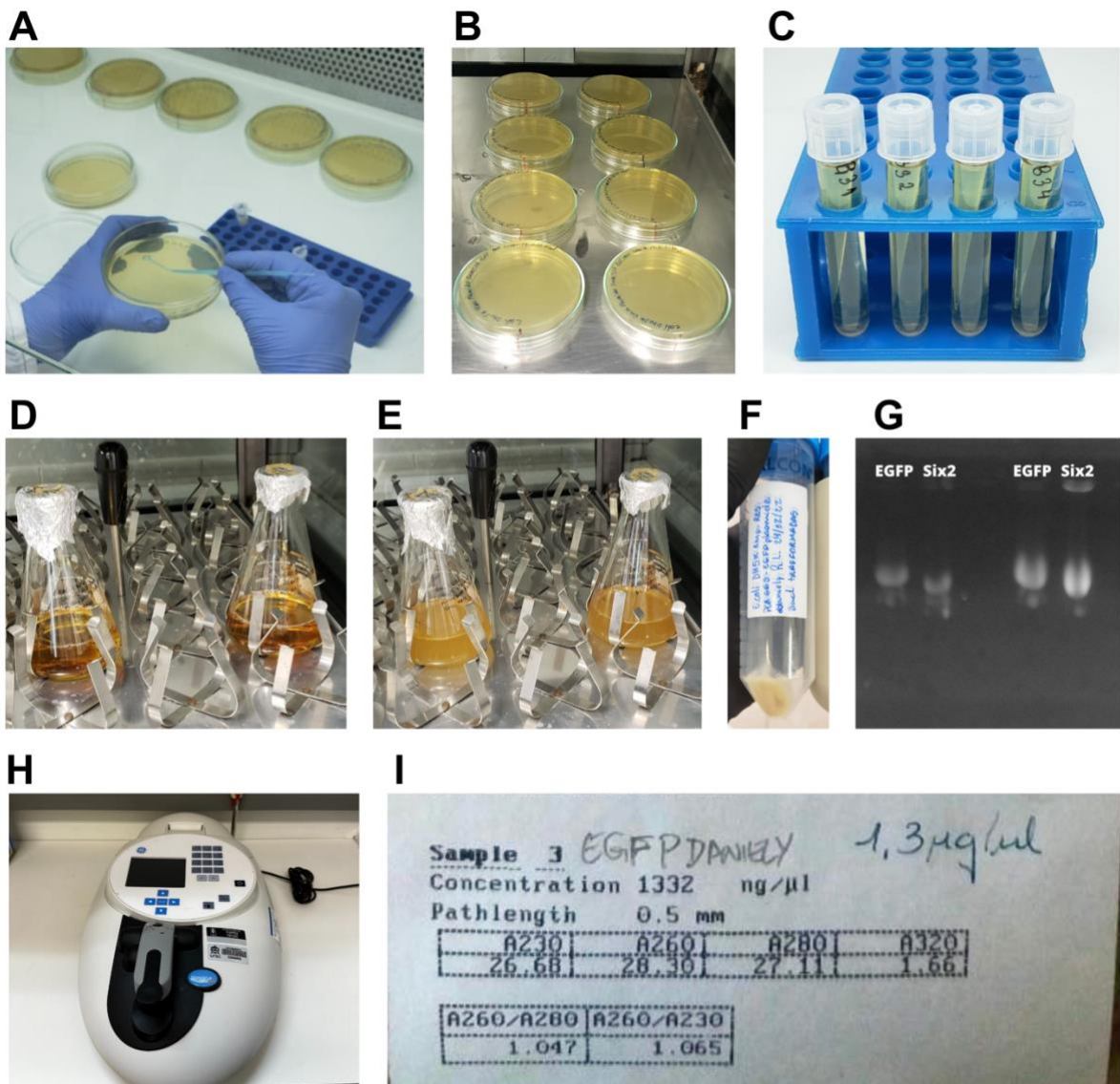
A sequência de DNA com a qual as bactérias foram transfectadas é uma sequência circular (plasmidial) contendo o gene da EGFP, ligado a um promotor constitutivamente ativo (promotor que possibilita a expressão de um determinado gene de maneira constante e contínua, pois é estimulado por fatores de transcrição sempre expressos pela célula). Para obter uma amostra plasmidial de alta qualidade, após a ampliação foi realizada a etapa de purificação para remoção de impurezas e resíduos do meio de cultura e das bactérias. Nessa etapa foi obtido plasmídeo a uma concentração de 1,3 ug/ul (FIGURA 10I). A análise espectrofotométrica mostrou grau de pureza apresentando valores de  $A_{260}/A_{280} = 1,047$ ;  $A_{260}/A_{230} = 1,065$  (conferir equipamento espectrofotômetro na FIGURA 10H).

#### **4.1.2 Teste de integridade do plasmídeo em gel de eletroforese**

Em seguida, para confirmar a integridade do plasmídeo purificado, foi realizada uma análise de eletroforese em gel de agarose. Nesse processo foi verificado que o plasmídeo estava íntegro, pois o mesmo apresentou uma banda única com o tamanho esperado com aproximadamente 6000pb (FIGURA 10G).

**Figura 10 – Etapas da produção do plasmídeo para a expressão da Proteína Fluorescente Verde: transfecção de bactérias, ampliação, purificação, teste em gel de eletroforese e dosagem.**

A - Semeadura/plaqueamento de bactérias transfectadas em placas de ágar; B - Incubação overnight e crescimento de bactérias transfectadas; C - Cultura de contraprova, Incubação de 8h de uma colônia isolada por tubo; D e E - Cultura grande nos tempos da 0h (zero) e 16h, respectivamente, constatando o crescimento bacteriano através do aumento da turbidez do meio; F - Visualização do concentrado de células resultante da centrifugação final da transfecção das bactérias; G - Gel de eletroforese confirmando a presença do plasmídeo CAGGS-EGFP e a integridade da amostra; H - Espectrofotômetro NanoVue utilizado na dosagem plasmidial; I - Resultado da dosagem do plasmídeo indicando uma concentração igual a 1332 ng/μL.



Fonte: elaborado pela autora



## 4.2 PADRONIZAÇÃO DA VOLTAGEM APLICADA NA ELETROPORAÇÃO

A técnica de eletroporação possui vários parâmetros que podem ser alterados. Neste trabalho investigar a variação dos resultados da eletroporação em função da voltagem aplicada foi um objetivo. É importante ressaltar que essa foi a primeira vez que esse eletroporador foi utilizado no laboratório. Além disso, esse é um experimento realizado em embriões muito frágeis. A padronização permite a otimização da técnica bem como aumenta a replicabilidade e a confiança nos resultados obtidos. A aplicação de uma baixa voltagem pode resultar na ausência de marcação, mas pode melhorar a sobrevivência dos embriões, por outro lado, a aplicação de uma voltagem excessiva pode gerar danos celulares e afetar negativamente o desenvolvimento embrionário e a viabilidade dos embriões eletroporadas (SCAAL *et al.*, 2004).

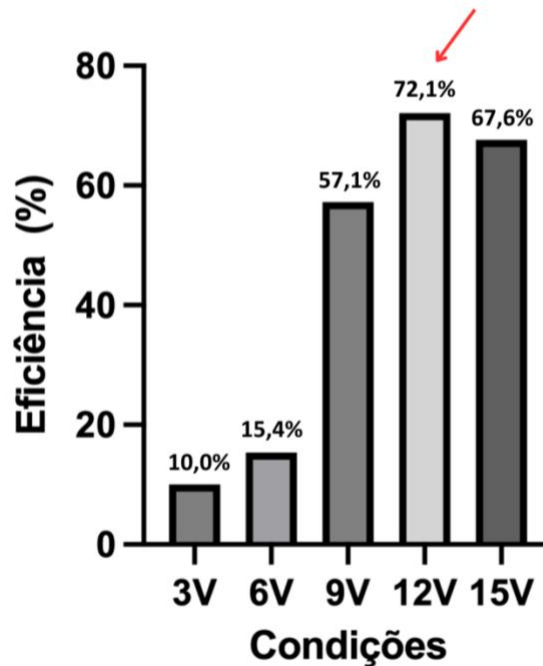
### 4.2.1 A eletroporação em embriões foi mais eficiente com 12V

A voltagem tem forte influência na efetividade da eletroporação e o seu controle ajuda na regulação do tamanho e do número de poros abertos e conseqüentemente na entrada de material genético exógeno. Durante os experimentos embriões de *G. gallus* com 5-10 pares de somitos (com 30-32h de desenvolvimento) uma curva de voltagem com 3, 6, 9, 12 e 15 Volts (FIGURA 12) foi realizada. O n amostral de cada condição foi de 10, 13, 21, 43 e 33 embriões, respectivamente. Após, pelo menos 24h, depois da aplicação do pulso elétrico, os embriões foram analisados em microscópio estereoscópico de epifluorescência. Selecionou-se qualitativamente os embriões conforme a marcação apresentada, desconsiderando os falsos positivos. Foi verificado que quando a eletroporação é aplicada com 3V, apenas 10% dos embriões apresentam marcação. Quando a voltagem foi de 6V, 15,4% dos embriões apresentam marcações. As voltagens de 9V, 12V e 15V possuem eficiência maior que 55%. Na condição de 9V, 57,1% dos embriões são marcados. O grupo que foi eletroporado com 12 Volts foi o que apresentou maior efetividade, com 72,1% dos embriões do grupo apresentando alguma marcação. Quando testada com 15V 67,6% dos embriões apresentaram marcação.

#### **Figura 11 – Eficiência da eletroporação (%) para diferentes voltagens.**

O eixo X do gráfico representa as condições/voltagens nas quais a eletroporação foi aplicada, sendo elas: 3V - 3 Volts; 6V - 6 Volts; 9V - 9 Volts; 12V - 12 Volts; 15V - Volts. O eixo Y representa a eficiência da eletroporação (%). Os valores em cima de cada coluna representam a porcentagem de eficiência alcançada na respectiva condição/voltagem. A seta em vermelho destaca a porcentagem (72,1%) da voltagem (12V) com maior eficiência.

## Eficiência da eletroporação por voltagem aplicada



Fonte: elaborado pela autora

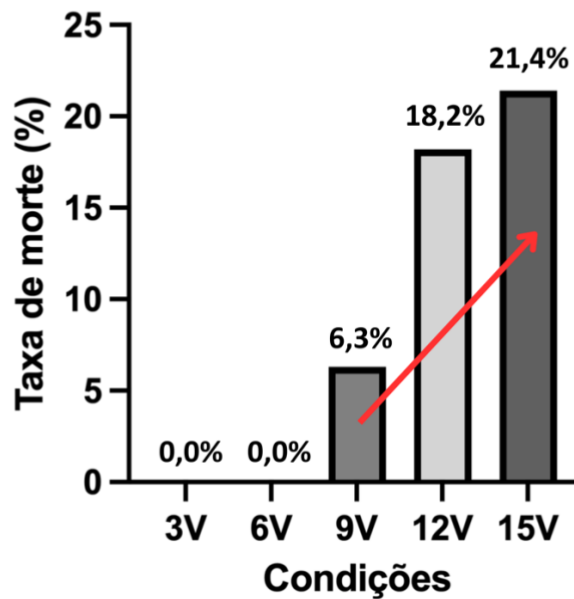
### 4.2.2 A taxa de mortalidade embrionária cresce em função do aumento da voltagem na eletroporação

Para que o procedimento de eletroporação possa ser utilizado experimentalmente, é fundamental que a manipulação dos embriões não interfira na sua viabilidade e que a técnica de eletroporação não cause a morte dos embriões. Para analisar a porcentagem de morte por grupo amostral, foi realizada uma avaliação a partir de 24h após a aplicação do pulso elétrico (FIGURA 13). O n de cada condição foi igual a: 3V = 10 embriões; 6V = 8 embriões; 9V = 16 embriões; 12V = 33 embriões; 15V = 28 embriões. Os grupos 3V e 6V não apresentaram indivíduos mortos 24h após a eletroporação. No grupo 9V 6,3% dos embriões estavam mortos após 24h. Quando a voltagem aplicada foi de 12 Volts a taxa de mortalidade foi de 18,2%. Já para o grupo de 15 Volts a taxa de morte aumentou para 21,4% (FIGURA 13). Através do teste de correlação de postos de Spearman foi possível confirmar a correlação entre o crescimento da voltagem e o aumento da taxa de mortalidade ( $r = 0,9747$  e  $P = 0,0333$ ).

**Figura 12 – Taxa de mortalidade embrionária em função da voltagem aplicada na eletroporação:**

O eixo X do gráfico representa as condições/voltagens nas quais a eletroporação foi aplicada, sendo elas: 3V - 3 Volts; 6V - 6 Volts; 9V - 9 Volts; 12V - 12 Volts; 15V - 15 Volts. O eixo Y representa a taxa de mortalidade (%) obtida após a eletroporação. Os valores em cima da cada coluna representam a porcentagem de morte alcançada na respectiva condição/voltagem. A seta em vermelho sinaliza a tendência de crescimento da taxa de mortalidade em função do aumento da voltagem.

**Taxa de morte por voltagem aplicada na eletroporação**



Fonte: elaborado pela autora

**4.2.3 Eletroporação com voltagens mais altas gera maior taxa de malformações (%)**

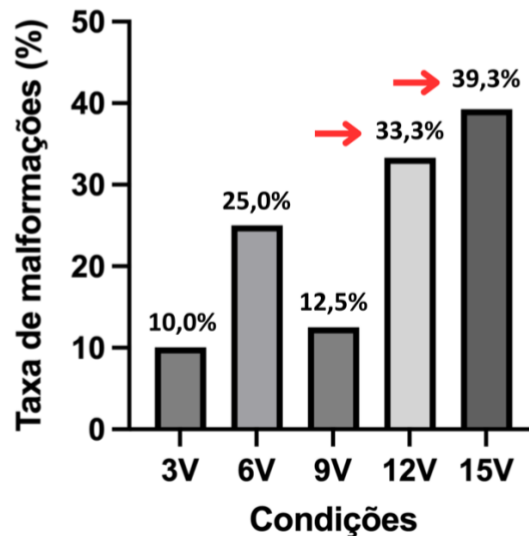
A manipulação dos embriões e a sua exposição a um pulso elétrico direcionado podem resultar em malformações no desenvolvimento embrionário. Estas anomalias podem ou não serem compatíveis com a vida dos embriões. Nesta análise identificou-se os embriões que apresentaram malformações após a eletroporação (FIGURA 14). Atrasos leves no desenvolvimento não foram considerados malformações devido a variações naturais que acontecem no desenvolvimento. Para compor a taxa de malformações de cada grupo amostral, avaliou-se o número de embriões que apresentaram malformações a partir de 24h depois da aplicação do pulso elétrico. O n de cada condição foi igual a: 3V = 10 embriões; 6V = 8 embriões; 9V = 16 embriões; 12V = 33 embriões; 15V = 28 embriões.

Os grupos 12V e 15V apresentaram as maiores taxas de malformações, 33,3% e 39,3% respectivamente. O grupo 3V apresentou a menor taxa de malformações, 10%, enquanto o grupo 6V alcançou uma taxa igual a 25%. O grupo que recebeu 9V obteve uma taxa de malformações de 12,5%, menor que o grupo 6V. A partir da análise dos resultados foi possível concluir que o número de malformações é maior em grupos com voltagens mais elevadas.

**Figura 13 – Taxa de malformações embrionárias (%) em função da voltagem aplicada na eletroporação:**

O eixo X do gráfico representa as condições/voltagens nas quais a eletroporação foi aplicada, sendo elas: 3V - 3 Volts; 6V - 6 Volts; 9V - 9 Volts; 12V - 12 Volts; 15V - Volts. O eixo Y representa a taxa de malformações (%) observadas a partir de 24h após a eletroporação. Os valores em cima da cada coluna representam a porcentagem de malformações constatadas nas respectivas condições/voltagens. As setas em vermelho destacam as maiores taxas de malformações (33,3% e 39,3%).

**Taxa de malformações por voltagem aplicada na eletroporação**



Fonte: elaborado pela autora

Baseado nos resultados anteriores de eficiência, 3 grupos foram escolhidos para dar seguimento às análises, 9V, 12V e 15V.

**4.3 AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE EGFP EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS***

Uma vez validada a efetividade da eletroporação, partiu-se para uma análise quantitativa da intensidade das marcações. Os dados foram gerados a partir da contagem de pixels e da normalização desses valores com base na medida de circunferência da vesícula ótica (VO), ambas as contagens geradas através do *software* ImageJ. Por fim, avaliou-se também a permanência do plasmídeo e a localização da marcação.

#### **4.3.1 Embriões eletroporados com 12V e 15V geraram marcações mais intensas e homogêneas**

A intensidade e a consistência das marcações geradas através da eletroporação são parâmetros importantes na busca pelo aprimoramento e otimização da técnica. Para avaliar estes indicadores, embriões que apresentaram marcações em 3 grupos (9V, 12V e 15V) foram selecionados para análise. O n amostral foi igual a 12, 31 e 23, respectivamente. Os embriões com 5 a 10 somitos foram eletroporados, devolvidos à incubadora e avaliados a partir de 24h para verificar se as marcações geraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e qual a dispersão desses dados (FIGURA 15).

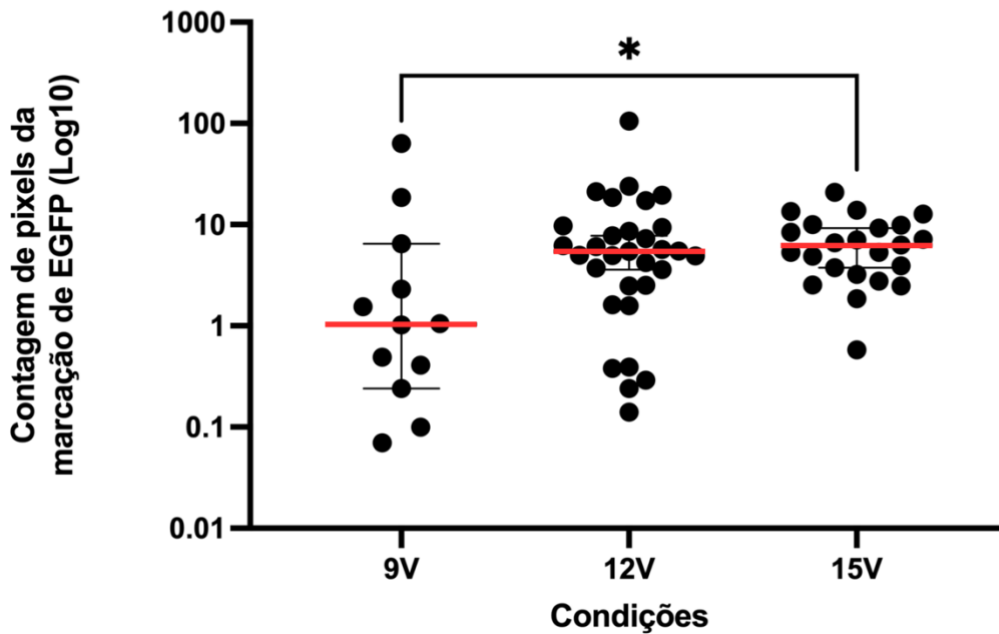
O grupo de embriões eletroporados com 9V apresentou uma maior dispersão (CDQ = 80,25) e uma média menor que os demais grupos (média dos postos 9V = 20,83). O grupo 12V apresentou uma faixa relativamente intermediária de dispersão (CDQ = 56,42), mas manteve sua média próxima do grupo 15V (média dos postos 12V = 34,92). O grupo que recebeu 15V apresentou a menor dispersão (CDQ = 46,37) e a maior média entre os grupos (média dos postos 15V = 38,20). As eletroporações realizada com 12V e 15V geraram marcações mais intensas e também mais homogêneas. Além disso, o teste estatístico revelou que não houve diferença estatística entre os grupos 9V e 12V, a diferença entre as médias dos postos foi de, aproximadamente, 1,67 vezes maior no grupo de 12V. Do grupo 12V para o 15V houve um aumento de ~1,09 vezes na intensidade das marcações, porém os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Já quando comparados os grupos 9V a 15V foi possível observar a existência de diferença estatística significativa entre as médias dos postos dos grupos, sendo que o grupo 15V apresentou marcações 1,83 vezes mais intensas que o grupo eletroporado com 9V.

#### **Figura 14 – Intensidade das marcações de EGFP em função da variação da voltagem na eletroporação.**

O eixo x do gráfico representa as condições de voltagem nas quais os embriões foram testados. O eixo y corresponde aos valores da contagem de pixels normalizada de cada

embrião em escala de Log10. As linhas mais finas na vertical em cima dos pontos representam os intervalos interquartis e a linha central horizontal em vermelho a mediana. A linha na horizontal na parte de cima do gráfico sinaliza a comparação entre os grupos. "\*" representa diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados.

### Teste de significância das marcações de EGFP em função da voltagem



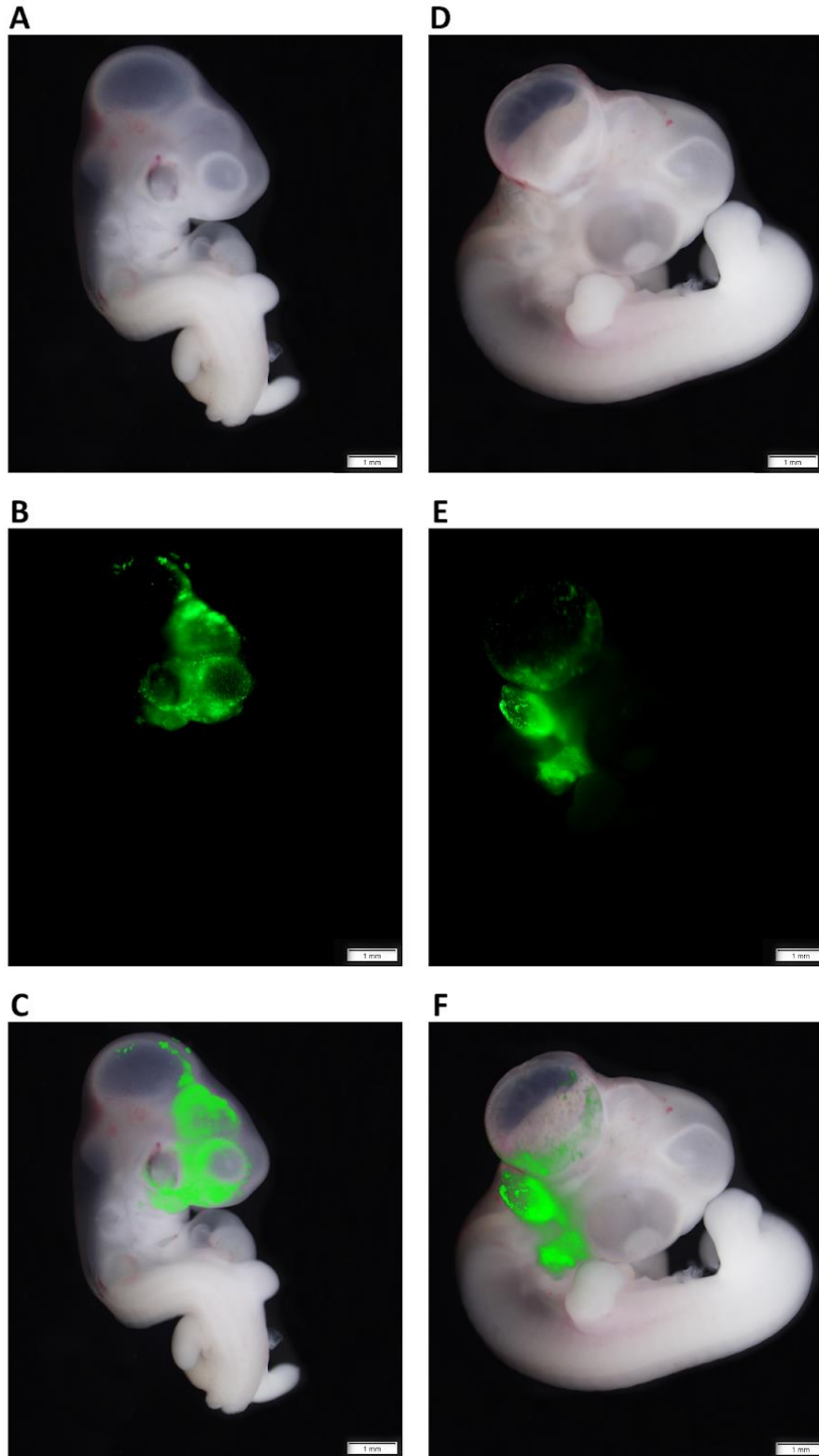
Fonte: elaborado pela autora

#### 4.3.2 A expressão do plasmídeo CAGGS-EGFP persiste pelo menos 72h após eletroporação

A marcação do plasmídeo CAGGS-EGFP é transitória, uma vez que esse plasmídeo não é integrado no genoma da célula. Para investigar a persistência da marcação EGFP foi realizada uma análise 3 dias (72 horas) após a aplicação do pulso elétrico. Para isso, uma eletroporação com 15V foi feita e os ovos retornaram para a incubadora. Constatou-se que a expressão da EGFP persiste, pelo menos, três dias após o procedimento de eletroporação. O resultado ainda evidenciou a capacidade da técnica de marcar regiões importantes para o estudo do desenvolvimento craniofacial (FIGURA 16).

**Figura 15 – Persistência da expressão de EGFP após eletroporação.**

**A e D** mostram embriões com 72h após eletroporação em vista lateral no campo claro. **B e E** mostram respectivamente os embriões **A e D** sob luz UV, destacando a marcação de EGFP. **C e F** mostram a sobreposição da marcação de EGFP nos embriões **A e D**, respectivamente.



Fonte: elaborado pela autora

### 4.3.3 O domínio da Crista Neural Cefálica foi marcado através do protocolo de eletroporação aplicado

Objetivou-se com este trabalho otimizar a técnica de eletroporação para gerar marcações na região da Crista Neural Cefálica. Para isso, o plasmídeo foi injetado dentro do Tubo Neural na região anterior do embrião, preenchendo todo o lúmen das vesículas encefálicas (rombencéfalo, mesencéfalo e prosencéfalo), em seguida, os eletrodos foram posicionados nas suas laterais do embrião sem tocá-lo. Foram avaliadas as posições das marcações nos embriões dos grupos tratados com 9V, 12V e 15V (FIGURA 17). As marcações foram divididas levando em consideração os domínios da CN, Crista Neural Cefálica (CNC), Crista Neural Vagal (CNV), Crista Neural Truncal (CNT) e Crista Neural Sacral (CNS) (FIGURA 18).

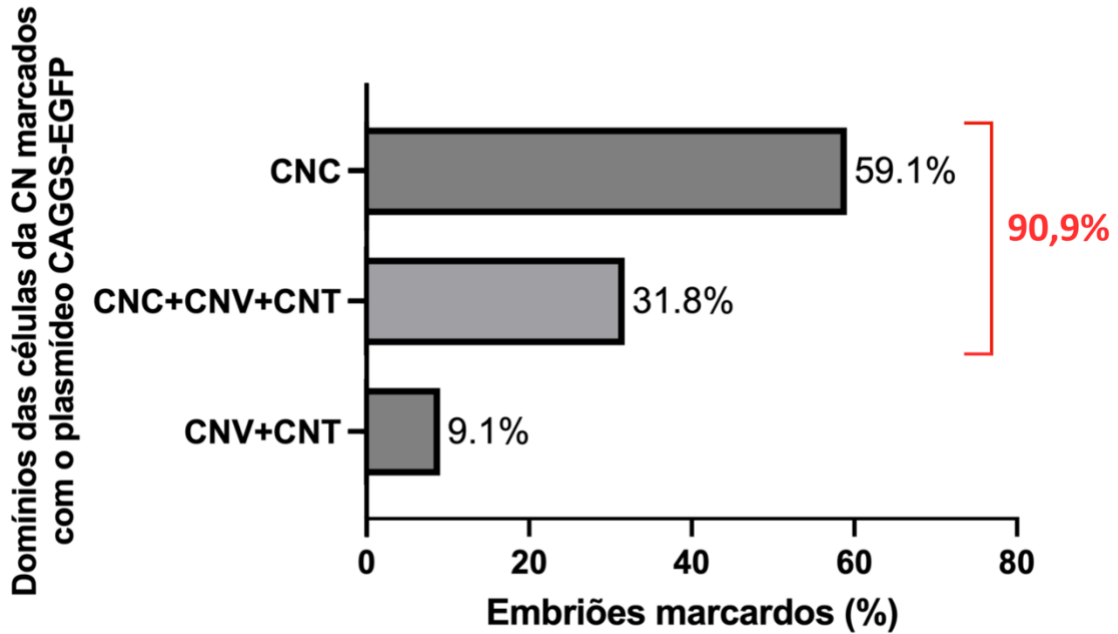
Observou-se que em 59,1% dos embriões as marcações foram específicas e se restringiram a CNC. 31,8% apresentou marcações na CNC e em mais algum domínio (CNV/CNT). Totalizando uma efetividade de marcação na CNC de 90,9%. E apenas 9,1% não marcou a CNC (FIGURA 17).

#### **Figura 16 – Posição das marcações de EGFP:**

No gráfico, o eixo Y representa os domínios nos quais as células da CN apresentaram marcação para o plasmídeo CAGGS-EGFP e em X a porcentagem para cada domínio. CNC compreende os embriões com marcações apenas na Crista Neural/Cefálica. CNC+CNV+CNT engloba os embriões que tiveram marcações na CNC e em mais algum domínio, como na CNV, CNT ou em ambas. Já o recorte CNV+CNT representa os embriões que exibiram marcações na CNV, CNT ou em ambas. Em vermelho destaca-se a soma das porcentagens com marcações efetivas na CNC (90,9 %).

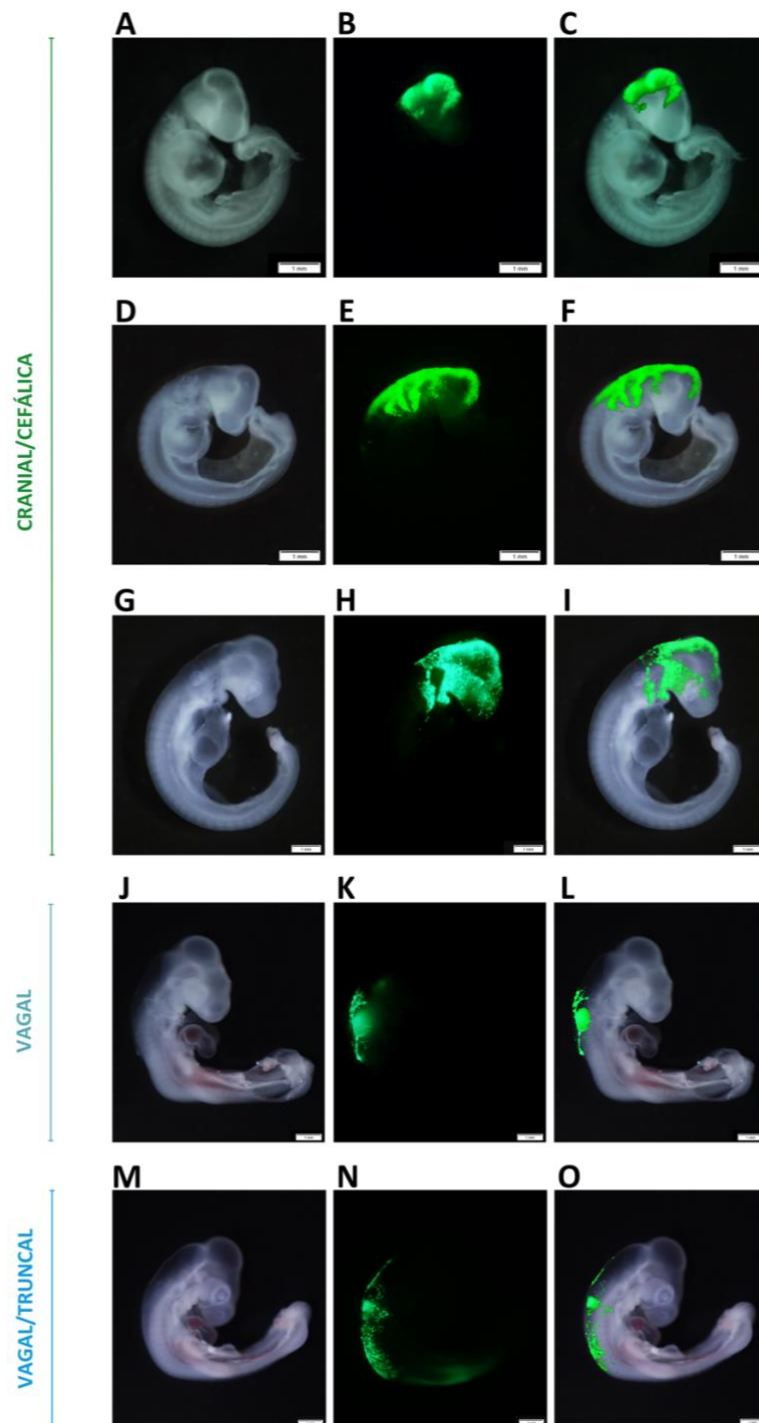


## Posição das marcações de EGFP



Fonte: elaborado pela autora

**Figura 17 – Domínios da CN com marcações do plasmídeo CAGGS-EGFP:**  
 A primeira coluna (**A, D, G, J e M**) corresponde a vista lateral em campo claro dos embriões a partir de 24h da eletroporação. Na segunda coluna (**B, E, H, K e N**) os embriões da respectiva linha estão em campo escuro com aplicação de luz UV e é possível ver a marcação do plasmídeo CAGGS-EGFP. A última coluna (**C, F, I, L e O**) corresponde a uma sobreposição da e expressão de EGFP no embrião em campo claro, possibilitando a visualização da localização das células da CN que foram eletroporadas. As barras na lateral esquerda sinalizam os domínios aos quais pertenciam as respectivas marcações.



Fonte: elaborado pela autora

#### 4.4 PROTOCOLO OTIMIZADO DA TÉCNICA DE ELETROPORAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNC EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS IN OVO*.

Através do trabalho desenvolvido, um protocolo de eletroporação otimizada para células da CNC em embriões de *G. gallus* foi construído:

## **Protocolo de Eletroporação em Embriões de *G. gallus*:**

### **Materiais e Equipamentos:**

Eletroporador Power Supply – Caltech Bio-Eletronics shop; Incubadora para ovos (Chocadeira elétrica automática ChocMais); Lupa Olympus SZ61; Microscópio estereoscópico (Estereoscópico Olympus SZX2-ILLB de epifluorescência); Solução Plasmidial (Plasmídeo CAGGS-EGFP + Corante Fast Green); Ovos fecundados (idade embrionária: HH 8 - 10); PBS 1X; Suporte para ovos; Descarte; Tesoura ou Pascheff-Wolff; Pinça; Fita adesiva atóxica; Mangueira sorológica; Capilares de vidro; Ponteiras; Pipeta Pasteur; Placa de Petri; Pipeta; Formol 4%; Computador; Tubo de ensaio plástico.

### **1. Obtenção e Preparação dos Embriões:**

- Adquira ovos de *G. gallus*.
- Mantenha os ovos a 18°C até iniciar o tempo de incubação.
- Incubar os ovos a 38°C por 30-32 horas ou até atingirem HH 8-10, com 5 a 10 somitos.

### **2. Configuração do Eletroporador Power Supply - Caltech Bio-Eletronics shop:**

- Configure o eletroporador com cristas de 30ms (ON) e vales de 100ms (OFF).
- Configure o equipamento para a aplicação de 5 pulsos com 12V.

### **3. Preparação da Solução Plasmidial:**

- Misture 1ul do plasmídeo CAGGS-EGFP [1,3ug/ul] com o corante vital Fast Green a 0,01%.
- Aspire a mistura para um capilar de vidro afinado.

### **4. Execução da Técnica de Eletroporação:**

- Com um auxílio de um suporte, posicione o ovo na lupa.
- Com uma tesoura, abra a casca do ovo para acessar o embrião.
- Remova a membrana amniótica com um capilar cortante.
- Adicione 2-3 gotas de PBS 1X com uma pipeta Pasteur.
- Injete a solução plasmidial no tubo neural.
- Posicione eletrodos nas laterais da região cefálica sem tocar no embrião.
- Acione o eletroporador manualmente apenas uma vez.
- Feche o ovo com fita adesiva e atóxica e retorne à incubadora. Evite o contato entre conteúdo do ovo e a fita.

### 5. Avaliação dos Embriões:

- Após 24h, retire os ovos da incubadora.
- Mantenha por 30 minutos na geladeira.
- Remova a fita com uma tesoura e confirme a sobrevivência na lupa.
- Isole o embrião e com uma mini escumadeira transfira-o para uma placa de Petri com em PBS 1X.
- Com uma Pascheff-Wolff e pinças, remova as membranas embrionárias e observe o embrião no microscópio com luz UV.
- Com um computador, fotografe os embriões.

### 6. Armazenamento dos Embriões:

- Fixe os embriões em formol 4%.
- Armazene em tubos de ensaio plásticos a 4°C, protegidos da luz.

Este protocolo permite a eletroporação eficiente em embriões de *G. gallus*, possibilitando análises posteriores e aplicações futuras de outras técnicas.

## 5 DISCUSSÃO

O foco principal deste estudo foi o desenvolvimento de um protocolo otimizado para eletroporação em embriões de *G. gallus* com enfoque nas células da Crista Neural Cefálica, por isso, como explicitado em trabalho antecedentes (DA SILVA, 2011; BROWN *et al.*, 2012; SCAAL *et al.*, 2004), investigar os parâmetros da eletroporação para garantir a viabilidade embrionária e a máxima eficácia da técnica é um passo fundamental.

Neste trabalho demonstrou-se que o plasmídeo CAGGS-EGFP foi amplificado com sucesso em linhagem de bactérias *E. coli* e sua integridade foi validada (FIGURA 3). A funcionalidade plasmidial também foi demonstrada com êxito uma vez que se pode verificar a marcação de EGFP nos embriões eletroporados (FIGURA 16 e 18). Os resultados obtidos corroboram com trabalhos anteriores que utilizaram o plasmídeo CAGGS-EGFP como *repórter* e que obtiveram marcações semelhantes ao eletroporarem os embriões de *G. gallus* (CÁRDENAS & BORRELL, 2021; FUNAHASHI *et al.*, 1999; MOMOSE *et al.*, 1999, YASUDA; MOMOSE & TAKAHASHI, 2000)

Em abordagens anteriores de outros grupos de pesquisa, a maior parte dos experimentos empregava uma voltagem entre 5 e 25V a depender do modelo animal, idade

embrionária, tipo de célula ou tecido de interesse, molécula eletroporada, tipo de cultura realizada, pergunta científica e equipamento utilizado (SIMOES-COSTA & BRONNER, 2016; MURKO & BRONNER, 2017; MOMOSE *et al.*, 1999; DAVE *et al.*, 2022; NORRIS & STREIT, 2014; SHTUKMASTER & HUBER, 2023; ODANI; HOU & NAKAMURA, 2009; CÁRDENAS & BORRELL, 2021; CHASTAGNIER; MARQUETTE & PETIOT, 2023). No trabalho aqui apresentado, 5 variações de voltagem foram testadas em embriões com 5 a 10 somitos, 3V, 6V, 9V, 12V e 15V. Na avaliação da eficiência da eletroporação em função da voltagem, a condição mais eficiente encontrada foi com 12V, na qual 72,1% dos embriões eletroporados apresentaram marcações. Os embriões que receberam 9V e 15V também apresentaram alta eficiência, 57,1% e 67,6% respectivamente. As variações com 3 e 6 volts foram pouco eficientes e marcaram apenas 10% e 15,4% dos embriões, respectivamente. Outros estudos com aplicação de voltagens na faixa dos 5V foram bem-sucedidos, porém variaram em outros parâmetros, como número de pulsos, a frequência e o tipo de cultura realizados (SIMOES-COSTA & BRONNER, 2016; MURKO & BRONNER, 2017; BROWN *et al.*, 2012; SUZUK & OGURA, 2008), o que pode explicar a diferença entre os resultados encontrados.

Neste sentido, vale ressaltar o papel crucial que a voltagem exerce na eletroporação. Quando a voltagem (diferença de potencial (DDP) entre dois eletrodos) é aplicada, as linhas do campo elétrico rearranjam os fosfolipídios das membranas celulares, criando, por milissegundos, os poros pelos quais o plasmídeo entra. O diâmetro dos poros e a capacidade de reorganização da membrana dependem dessa DDP gerada. A voltagem utilizada deve então ser suficiente para criar os poros, mas não provocar a lise celular. Por isso, a escolha de uma voltagem adequada é tão importante para o sucesso da eletroporação (DA SILVA, 2011).

Ao avaliar a mortalidade embrionária em função da variação da voltagem, verificou-se que o aumento da voltagem aumenta a taxa de morte (FIGURA 13). Os grupos com aplicação de voltagens mais baixas (3V e 6V) não apresentaram morte. Os grupos com 9V, 12V e 15V apresentaram 6,3%, 18,2% e 21,4% de mortalidade. Do grupo 9V para 12V o aumento foi de ~2,88 vezes, enquanto de 12V para 15V foi de ~1,18 vezes. Apesar da taxa de mortalidade com 15V ser a mais alta, a sobrevivência desse grupo supera a encontrada em outro trabalho com a utilização de baixa voltagem (5V) (BROW *et al.*, 2012) e a taxa de sucesso esperada para experimentos de eletroporação *in ovo* com análises após 24h (ROTHSTEIN; BHATTACHARYA & SIMOES-COSTA, 2018), ou seja, ainda que a mortalidade desse grupo seja a maior entre as condições testadas, a técnica aqui aplicada possui alta eficiência.

A taxa de malformações embrionárias também foi avaliada. Observou-se que a incidência de malformações é maior em grupos com aplicações de voltagens mais elevadas,

12V e 15V, com 33,3% e 39,3%, respectivamente. Os grupos 3V, 6V e 9V apresentaram as seguintes taxas: 10,0%, 25,0% e 12,5%, respectivamente (FIGURA 14). O fato da taxa de malformações aumentar justamente nos grupos nos quais a taxa de mortalidade também é maior e nos quais a voltagem é mais elevada indica que tanto as mortes quanto as malformações são causadas pelo aumento da voltagem. Ao mesmo tempo, ao considerar essa relação, é preciso notar uma variação fora do padrão esperado no grupo 9V, visto que este apresenta uma taxa ~2 vezes menor que a do grupo 6V e ~2,6 vezes menor que a do grupo que recebeu 12V. Variações na viabilidade e qualidade dos ovos podem ajudar a explicar as taxas de malformações encontradas. Além dessa variação biológica, a proximidade dos eletrodos também é um parâmetro importante que deve ser investigado uma vez que distâncias muito curtas entre os eletrodos ou o seu toque nos tecidos embrionários podem causar queimaduras levando a morte e/ou malformações embrionárias (SCAAL *et al.*, 2004; HATAKEYAMA & SHIMAMURA, 2009; ODANI; HOU & NAKAMURA, 2009; MASYUK *et al.*, 2014).

A morte embrionária poderia ser explicada pela lise de um grande número de células ou de células essenciais para o desenvolvimento, devido a voltagem aplicada, uma vez que, como explicado anteriormente, as células podem perder o seu potencial de reorganização da membrana plasmática, e assim a sua capacidade de manter a homeostase. No caso das malformações, cogita-se que um número menor de células morra, provocando alterações morfológicas no desenvolvimento dos tecidos e estruturas embrionárias. Uma possibilidade ainda seria que a perda de íons também seja um mecanismo presente e capaz de provocar a perda da homeostase e induzir a célula à morte. Para que essas hipóteses sejam testadas, ensaios específicos ainda são necessários.

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, 3 grupos, 9V, 12V e 15V, foram selecionados para dar continuidade às investigações devido a capacidade de gerarem transfecções eficientes (>55%). Na análise da intensidade das marcações de EGFP, o grupo que recebeu 9V exibiu uma média dos postos menor na intensidade das marcações e uma maior dispersão. O grupo 12V, por sua vez, apresentou uma média dos postos de marcação ~1,68 vezes maior que o grupo com 9V e a dispersão nos valores das marcações foi intermediária. Por fim, o grupo 15V apresentou a maior média dos postos de intensidade da marcação de EGFP (~1,09 vezes maior que o grupo 12V) e a dispersão foi a menor entre todos os grupos. Apenas a comparação entre os grupos 9V a 15V gerou diferença estatisticamente significativa (FIGURA 15). Uma possível explicação para este resultado é baseada na maior capacidade que voltagens mais elevadas possuem de abrirem poros nas membranas celulares e,

consequentemente, permitem a entrada de mais cópias do plasmídeo, gerando marcações mais intensas e homogêneas.

No artigo original que descreve o plasmídeo CAGGS-EGFP, os autores relatam uma fácil visualização da sua marcação entre um intervalo de 16 e 24h (ZHANG; GURTU & KAIN, 1996). Trabalhos mais recentes (SUZUKI & OGURA, 2008; BROWN *et al.*, 2012) demonstraram a visualização dessa marcação de 1 a 3 e de 3 a 5 horas após a eletroporação, além de uma persistência de até 3 dias (MOMOSE *et al.*, 1999). No presente estudo, a fim de validar a persistência da marcação do plasmídeo CAGGS-EGFP os embriões foram mantidos até 3 dias após a eletroporação. Corroborando com os estudos anteriores, a marcação persistiu. Por meio da localização da marcação após os 3 dias, foi possível destacar o processo de migração e povoamento da região craniofacial pelas células da CN (FIGURA 16).

A especificidade da marcação é um componente central na busca pela otimização da eletroporação para embriões de *G. gallus*. Neste trabalho objetivou-se a marcação na CN cefálica, o que foi obtido em 90,9% das observações e pode ser verificado nas Figuras 17 e 18. Diferentemente do que outros trabalhos relatam (NAKAMURA & FUNAHASHI, 2001; ODANI; HOU & NAKAMURA, 2009) sobre seus procedimentos, nos quais apenas as células de um dos lados do tubo neural são transfectadas, aqui uma parcela dos embriões apresentou marcações nos dois lados. Uma possível explicação para este resultado pode ser a variação na inclinação dos eletrodos durante a aplicação do pulso elétrico, resultando na eletroporação de uma faixa maior de células da CNC e não apenas de um dos lados. É importante ressaltar que na idade embrionária escolhida (HH8-10), espera-se que as células da CN pré-migratórias estejam nas bordas do tubo neural, e por isso durante a aplicação do pulso elétrico os eletrodos foram propositalmente inclinados, estando o eletrodo negativo mais abaixo e o eletrodo positivo mais acima, a uma distância de ~6mm um do outro e sem tocar no tecido embrionário. Uma outra explicação tem relação com as linhas do campo elétrico que se formam entre os dois eletrodos, uma vez que muitas delas são curvas, o que por si só poderia levar a transfecção de um domínio além do delimitado entre os dois eletrodos.

De forma geral, esse trabalho demonstrou que a escolha da voltagem é fundamental para o sucesso da eletroporação. Para os parâmetros utilizados, 12V mostrou-se a voltagem mais eficaz pois produz marcações intensas e homogêneas ao mesmo tempo que não provoca tantas mortes e malformações como uma voltagem mais alta. O protocolo de eletroporação aqui utilizado pode ser aplicado no estudo das células da CN cefálica.

Faz-se necessário ainda, evidenciar que outros parâmetros não abordados neste trabalho podem influenciar na otimização da técnica, e estudos posteriores devem

complementar esta análise. Além disso, vale salientar que para cada cenário, com mudanças nas condições de realização da técnica de eletroporação, é importante revalidar a otimização dos parâmetros como voltagem, número de pulsos, frequência e posição dos eletrodos, lembrando que tanto o equipamento quanto o modelo animal e a pergunta a qual pretende-se responder, são relevantes para esse processo e estudos como este podem servir como um bom ponto de partida.

## 6 CONCLUSÕES

- O plasmídeo CAGGS-EGFP foi produzido em sistema bacteriano com sucesso, sendo validado *in vivo* para procedimentos de eletroporação em embriões de *G. gallus*;
- A faixa de voltagem entre 9, 12 e 15V revelou-se eficiente para a aplicação da técnica de eletroporação em embriões de *G. gallus*;
- O aumento da voltagem está relacionado ao crescimento da taxa de mortalidade embrionária na eletroporação;
- O crescimento da taxa de malformações é maior em eletroporações realizadas com 12 e 15V;
- O protocolo executado possibilitou a marcação exitosa na região da CNC;
- A expressão da proteína EGFP foi verificada até, pelo menos, 72h depois da eletroporação;
- Em conjunto com os demais parâmetros utilizados, a tensão de 12V revelou-se a mais eficiente para marcar as células da CNC em embriões de *G. gallus*;
- Por fim, para as condições testadas, o embrião de *G. gallus* confirmou-se como um ótimo modelo para o estudo da embriologia.

## 7 PERSPECTIVAS

A partir da pesquisa desenvolvida e dos resultados alcançados, imaginou-se algumas possibilidades de trabalho para análises futuras, as quais estão elencadas a seguir:

- Investigar a eficiência da técnica de eletroporação comparando a variação de outros parâmetros como: quantidade de pulsos, duração do pulso e distância e estabilidade dos eletrodos;



- Realizar ensaios de bloqueio ou superexpressão dos genes Noggin, Gremlin, Shh, Six2, Fgfr2, Msx, Bmp4 e Fgf8 em células da CNC, com foco na compreensão dos mecanismos moleculares relacionados com as malformações causada pelo Zika Vírus e previamente discutidas por esse grupo de pesquisa;
- Averiguar a aplicação da eletroporação nos demais domínios da CN a fim de padronizar e possibilitar o desenvolvimento de estudos posteriores;
- Estudar a regulação gênica eletroporando embriões de *G. gallus* com intensificadores de regiões ou tipos de células específicas para garantir uma eletroporação mais direcionada.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Juliana de Mattos Coelho. **O Potencial de Diferenciação Mesenquimal da Crista Neural Truncal**. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, 2012.
- BENEVENUTTI, Felipe Zanghelini. **Influência do vírus da zika no desenvolvimento do sistema nervoso central e dos ossos cranianos em embriões de *Gallus gallus domesticus***. Trabalho de Conclusão de curso. Repositório institucional da UFSC, 2022.
- BHATHEJA, Kanav; FIELD, Jeffrey. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 12, p. 1995-1999, 2006.
- BRONNER-FRASER, Marianne. Riding the crest for 150 years!. **Developmental Biology**, v. 444, n. S1, p. S1-S2, 2018.
- BROWN, Charmaine Y. *et al.* *In vivo* electroporation of E1 chick embryos. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 8, p. pdb. prot069708, 2012.
- BRUET, Emmanuel *et al.* The Emerging Roles of the Cephalic Neural Crest in Brain Development and Developmental Encephalopathies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 9844, 2023.
- CALLONI, Giordano W. *et al.* Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19879-19884, 2007.
- CÁRDENAS, Adrián; BORRELL, Víctor. A protocol for *in ovo* electroporation of chicken and snake embryos to study forebrain development. **STAR protocols**, v. 2, n. 3, p. 100692, 2021.
- CHANG, Donald (Ed.). **Guide to electroporation and electrofusion**. Academic Press, 1991.
- CHASTAGNIER, Laura; MARQUETTE, Christophe; PETIOT, Emma. In situ transient transfection of 3D cell cultures and tissues, a promising tool for tissue engineering and gene therapy. **Biotechnology Advances**, p. 108211, 2023.
- CHERNET, Brook T.; LEVIN, Michael. Protocol for mRNA electroporation of *Xenopus laevis*. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 4, p. 447, 2012.
- COHEN, Stanley N. *et al.* Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973.
- COLE, Kenneth Stewart. **Membranes, ions, and impulses: a chapter of classical biophysics**. Univ of California Press, 1968.
- CREUZET, Sophie *et al.* Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 4843-4847, 2004.

CRUZ, Peterson da. **Desenvolvimento de metodologias de infecção e diagnóstico de ZIKV direcionadas à identificação dos sítios de infecção em embriões de *Gallus gallus*.** Dissertação de mestrado. Repositório institucional da UFSC, 2023.

DA SILVA, Mariana Dias. **Desenvolvimento e avaliação de um gerador programável de pulsos monofásicos de campo elétrico para eletroporação.** MSc. Thesis, 2011.

DAVE, Mohit *et al.* A Novel Egg-In-Cube System Enables Long-Term Culture and Dynamic Imaging of Early Embryonic Development. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 893736, 2022.

DI GREGORIO, Anna; LEVINE, Michael. Analyzing gene regulation in ascidian embryos: new tools for new perspectives. **Differentiation**, v. 70, n. 4-5, p. 132-139, 2002.

DIENER, Johanna; SOMMER, Lukas. Reemergence of neural crest stem cell-like states in melanoma during disease progression and treatment. **Stem cells translational medicine**, v. 10, n. 4, p. 522-533, 2021.

DUPIN, Elisabeth *et al.* The issue of the multipotency of the neural crest cells. **Developmental Biology**, v. 444, p. S47-S59, 2018.

DUVAL, Mathias. **Atlas d'embryologie.** G. Masson, 1889.

ELLIS, Kaitlyn Elizabeth; DOMAGALA, Drue Marie; CARON, Sophie Jeanne Cecile. Mapping Kenyon cell inputs in *Drosophila* using dye electroporation. **STAR protocols**, v. 4, n. 4, p. 102478, 2023.

FUNAHASHI, Jun-ichi *et al.* Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. **Development, growth & differentiation**, v. 41, n. 1, p. 59-72, 1999.

GANS, Carl; NORTHCUTT, R. Glenn. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 268-273, 1983.

GARCIA, Paul *et al.* The chicken embryo model: a novel and relevant model for immune-based studies. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 791081, 2021.

HAMBURGER, Viktor; HAMILTON, Howard L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HATAKEYAMA, Jun; SHIMAMURA, Kenji. Method of electroporation for the early chick embryo. **Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology**, p. 43-53, 2009.

HIS, Wilhelm. **Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes: die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei.** FCW Vogel, 1868.

HU, Na; STROBL-MAZZULLA, Pablo H.; BRONNER, Marianne E. Epigenetic regulation in neural crest development. **Developmental biology**, v. 396, n. 2, p. 159-168, 2014.

INOUE, Koji *et al.* Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. **Cell differentiation and development**, v. 29, n. 2, p. 123-128, 1990.

ITASAKI, Nobue; BEL-VIALAR, Sophie; KRUMLAUF, Robb. Shocking developments in chick embryology: electroporation and *in ovo* gene expression. **Nature cell biology**, v. 1, p. E203-E208, 1999.

JACKSON, David A.; SYMONS, Robert H.; BERG, Paul. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, 1972.

JAENISCH, Rudolf; MINTZ, Beatrice. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 71, n. 4, p. 1250-1254, 1974.

LAGO, Chiara *et al.* Medulloblastoma and high-grade glioma organoids for drug screening, lineage tracing, co-culture and *in vivo* assay. **Nature Protocols**, p. 1-40, 2023.

LE DOUARIN, Nicole M. The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. **Mechanisms of development**, v. 121, n. 9, p. 1089-1102, 2004.

LE DOUARIN, Nicole. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. **Developmental biology**, v. 30, n. 1, p. 217-222, 1973.

LE DOUARIN, Nicole. Details of the interphase nucleus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Bull. Biol. Fr. Belg.**, v. 103, p. 435-452, 1969.

LE DOUARIN, Nicole; KALCHEIM, Chaya. **The neural crest**. Cambridge university press, 1999.

LE DOUARIN, Nicole; TEILLET, Marie-Aimée. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **Development**, v. 30, n. 1, p. 31-48, 1973.

MARABLE, Sierra S.; BRONNER, Marianne E. Reprogramming of trunk neural crest to a cranial crest-like identity alters their transcriptome and developmental potential. **Differentiation**, v. 131, p. 27-37, 2023.

MARTIK, Megan L. *et al.* Evolution of the new head by gradual acquisition of neural crest regulatory circuits. **Nature**, v. 574, n. 7780, p. 675-678, 2019.

MARTIK, Megan L.; BRONNER, Marianne E. Riding the crest to get a head: neural crest evolution in vertebrates. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 616-626, 2021.

MASYUK, Maryna *et al.* Combination of *in ovo* electroporation and time-lapse imaging to study migrational events in chicken embryos. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 5, p. 690-698, 2014.

MILLER, Sophie R. *et al.* Neural crest Notch/Rbpj signaling regulates olfactory gliogenesis and neuronal migration. **Genesis**, v. 56, n. 6-7, p. e23215, 2018.

MOMOSE, Tsuyoshi *et al.* Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. **Development, growth & differentiation**, v. 41, n. 3, p. 335-344, 1999.

MURAMATSU, Tatsuo *et al.* Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos *in ovo*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 230, n. 2, p. 376-380, 1997.

MURAMATSU, Tatsuo; MIZUTANI, Yoshimoto; OKUMURA, Jun-ichi. Live detection of the firefly luciferase gene expression by bioluminescence in incubating chicken embryos. **Nihon Chikusan Gakkaiho**, v. 67, n. 10, p. 906-909, 1996.

MURAMATSU, TATSUO; NAKAMURA, AKIHIRO; PARK, H. M. *In vivo* electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals. **International journal of molecular medicine**, v. 1, n. 1, p. 55-117, 1998.

MURKO, Christina; BRONNER, Marianne E. Tissue specific regulation of the chick Sox10E1 enhancer by different Sox family members. **Developmental biology**, v. 422, n. 1, p. 47-57, 2017.

NAKAMURA, Harukazu; FUNAHASHI, Junichi. Electroporation: past, present and future. **Development, growth & differentiation**, v. 55, n. 1, p. 15-19, 2013.

NAKAMURA, Harukazu; FUNAHASHI, Jun-ichi. Introduction of DNA into chick embryos by *in ovo* electroporation. **Methods**, v. 24, n. 1, p. 43-48, 2001.

NEUMANN, E. Gene delivery by membrane electroporation. In: **Electrical manipulation of cells**. Boston, MA: Springer US, 1996. p. 157-183.

NEUMANN, Eberhard *et al.* Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO journal**, v. 1, n. 7, p. 841-845, 1982.

NEUMANN, Eberhard; ROSENHECK, Kurt. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. **The Journal of membrane biology**, v. 10, n. 1, p. 279-290, 1972.

NIWA, Hitoshi; YAMAMURA, Ken-ichi; MIYAZAKI, Jun-ichi. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. **Gene**, v. 108, n. 2, p. 193-199, 1991.

NORRIS, Anneliese; STREIT, Andrea. Morpholinos: studying gene function in the chick. **Methods**, v. 66, n. 3, p. 454-465, 2014.

ODANI, Noritaka; HOU, Xubin; NAKAMURA, Harukazu. *In ovo* electroporation as a useful tool to pursue molecular mechanisms of neural development in chick embryos. **Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology**, p. 9-16, 2009.

PCAGGS-EGFP. **Life Science Market**, 2023. Disponível em: <https://lifescience-market.com/plasmid-c-94/pcaggsegfp-p-117978.html>. Acesso em: 20 de novembro de 2023.

PRASANNA, G. Lakshmi; PANDA, T. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. **Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 5, p. 261-264, 1997.

RIBATTI, Domenico; ANNESE, Tiziana. Chick embryo in experimental embryology and more. **Pathology-Research and Practice**, p. 154478, 2023.

ROTHSTEIN, Megan; BHATTACHARYA, Debadrita; SIMOES-COSTA, Marcos. The molecular basis of neural crest axial identity. **Developmental biology**, v. 444, p. S170-S180, 2018.

ROTHSTEIN, Megan; SIMOES-COSTA, Marcos. On the evolutionary origins and regionalization of the neural crest. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2023. p. 28-35.

SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 148, n. 3, p. 781-788, 1967.

SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on micro-organisms: III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 163, n. 1, p. 37-43, 1968.

SATO, Yuki *et al.* Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. **Developmental biology**, v. 305, n. 2, p. 616-624, 2007.

SCAAL, Martin *et al.* **In ovo electroporation of avian somites. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 229, n. 3, p. 643-650, 2004.

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SHIMOGORI, Tomomi; OGAWA, Masaharu. Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain. **Development, growth & differentiation**, v. 50, n. 6, p. 499-506, 2008.

SHTUKMASTER, Stella; HUBER, Katrin. The role of the Notch signalling pathway in regulating the balance between neuronal and nonneuronal cells in sympathetic ganglia and the adrenal gland. **PloS one**, v. 18, n. 2, p. e0281486, 2023.

SIMÕES-COSTA, Marcos; BRONNER, Marianne E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, v. 142, n. 2, p. 242-257, 2015.

SIMOES-COSTA, Marcos; BRONNER, Marianne E. Reprogramming of avian neural crest axial identity and cell fate. **Science**, v. 352, n. 6293, p. 1570-1573, 2016.

SOUZA, Camila Santos de. **Análise da influência do vírus da Zika sobre a sinalização de Ácido Retinóico no desenvolvimento craniofacial**. Dissertação de mestrado. Repositório institucional da UFSC, 2023.

SUZUKI, Takayuki; OGURA, Toshihiko. Congenic method in the chick limb buds by electroporation. **Development, growth & differentiation**, v. 50, n. 6, p. 459-465, 2008.

TAUFER, Nathali Parise. **Influência do vírus da Zika sobre a via de sinalização coordenada pelos fatores de transcrição Six1 e Six2 no desenvolvimento cerebral inicial**. Dissertação de mestrado. Repositório institucional da UFSC, 2023.

TSONG, Tian Y. Electroporation of cell membranes. **Biophysical journal**, v. 60, n. 2, p. 297-306, 1991.

WILLIAMS, Ruth M.; SAUKA-SPENGLER, Tatjana. Ex ovo electroporation of early chicken embryos. **STAR protocols**, v. 2, n. 2, p. 100424, 2021.

WONG, Tai-Kin; NEUMANN, Eberhard. Electric field mediated gene transfer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 107, n. 2, p. 584-587, 1982.

YASUDA, Kunio; MOMOSE, Tsuyoshi; TAKAHASHI, Yoshiko. Applications of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. **Development, growth & differentiation**, v. 42, n. 3, p. 203-206, 2000.

ZHANG, Guohong; GURTU, Vanessa; KAIN, Steven R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 227, n. 3, p. 707-711, 1996.

ZIMMERMANN, U.; VIENKEN, J.; PILWAT, G. Development of drug carrier systems: electrical field induced effects in cell membranes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 116, p. 553-574, 1980.