

# Transfecção do coração de embriões de galinha (*Gallus gallus*) *in vivo* utilizando lipofectamina para a análise funcional de genes

**Palavras-Chave:** Doenças cardiovasculares, Transfecção, Embrião de galinha

**Autores(as):**

**Erika Track Martins, IB – Unicamp**

**Igor Buzzatto Leite, IB – Unicamp**

**Bento Silva Bergamaschi, IB – Unicamp**

**Thaís Metzker Pinto, IB – Unicamp**

**Jórdan Fares Sampar, IB – Unicamp**

**Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, IB – Unicamp**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Elvira Alvares (orientadora), IB - Unicamp**

---

## INTRODUÇÃO

As doenças cardíacas congênitas representam aproximadamente um terço das principais anomalias congênitas mundialmente (VAN DER LINDE et al., 2011). No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 25.757 casos novos a cada ano, sendo a região Sudeste a que apresenta a maior prevalência, com 10 casos novos a cada 1.000 nascidos vivos (MADRUGA et al., 2023) Diante desse cenário, compreender as bases genéticas das malformações cardíacas e identificar os genes relacionados a esses quadros não só proporciona um maior entendimento dos mecanismos subjacentes da doença, como também abre caminhos para intervenções terapêuticas direcionadas à melhora dos desfechos clínicos.

Uma vez que os mecanismos de desenvolvimento são conservados entre as espécies, pesquisas com organismos modelo podem fornecer *insights* sobre as causas das doenças congênitas humanas. Nesse sentido, os embriões de galinha são organismos modelo que podem ser empregados para a caracterização dos mecanismos celulares e genéticos que participam do desenvolvimento do coração (WITTIG e MUNSTERBERG, 2016), possibilitando a identificação da origem de malformações congênitas. Entre as metodologias para esse tipo de análise destaca-se a eletroporação, que permite a análise funcional de genes. Contudo, a técnica frequentemente causa malformações (TOMIZAWA; TABIN; ATSUTA, 2021).

Tendo em vista este cenário, a transfecção de células embrionárias com lipofectamina emerge como uma alternativa à eletroporação, por causar baixo estresse aos tecidos alvo (YIP, 2020). Assim,

esta pesquisa teve como objetivo otimizar os protocolos de transfecção do coração de embriões de galinha utilizando Lipofectamina 2000, considerando parâmetros como a eficiência da transfecção, o local de injeção, além das taxas de sobrevivência e malformações dos embriões, a fim de viabilizar futuras análises funcionais de genes.

## **METODOLOGIA**

### **1. PREPARO DAS INJEÇÕES E PROCESSAMENTO DOS EMBRIÕES**

Preparamos duas soluções para injeção contendo 25% de seu volume em Lipofectamina 2000 (TAKASE e TAKAHASHI, 2019) e diferentes concentrações de pCMV-eGFP em meio DMEM enriquecido com glicose para averiguar a influência da quantidade de DNA na otimização do protocolo. O primeiro protocolo foi elaborado visando obter-se uma solução que, em seu volume final, apresentasse 100 nanogramas de pCMV-eGFP por microlitro. Já o segundo protocolo foi elaborado a fim de obter-se uma concentração final de 200 nanogramas de pCMV-eGFP por microlitro de solução preparada.

As soluções foram aplicadas a embriões nos estádios HH14-HH15 a partir da injeção de 1 ul de solução pela veia cardinal, aorta dorsal direita ou diretamente no coração. Essa variação no local de injeção foi empregada para avaliar o melhor posicionamento da agulha de injeção para a realização do procedimento. Após um *overnight*, os embriões foram submetidos à análise de fluorescência com filtro próprio para GFP e, em seguida, foram coletados e colocados em solução fixadora (PFA 4%). As taxas de malformações e sobrevivência gerais foram calculadas e foi estabelecida a taxa de eficiência da transfecção com relação aos embriões vivos.

### **2. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* E SECCIONAMENTO EM MICRÓTOMO DE LÂMINA VIBRATÓRIA**

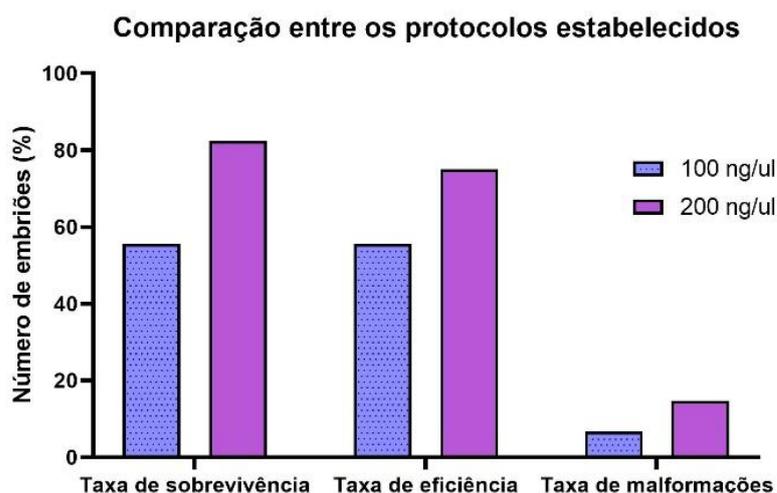
A hibridação *in situ whole-mount* foi realizada utilizando uma sonda antissenso de RNA, sintetizada a partir da transcrição de produtos de PCR purificados obtidos a partir de clones de GFP. A etapa de hibridação foi realizada em banho maria a 70°C, utilizando-se a sonda sintetizada. Posteriormente, foi empregado o anticorpo Anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina, que em condições ideais de reação produz um precipitado roxo a partir do consumo do substrato NBT/BCiP. Os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente pelo grupo de pesquisa (ALVARES et al. 2009) e os embriões foram fotografados.

Após a hibridação, os embriões passaram por uma sequência decrescente de imersões em glicerol (80%, 50%, 20%), seguidas por tratamento com gelatina em concentrações crescentes (1%, 5%, 10%, 15%). Por fim, os embriões foram incluídos em gelatina a 20% e cortados em micrótomo de lâmina vibratória em secções transversais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto ao local de injeção, a realização do procedimento pela aorta dorsal direita revelou propensão a causar hemorragias, além de ser de difícil acesso devido à profundidade do vaso. Já a injeção direta no coração também apresentou desafios, dado que o batimento do coração prejudica a estabilização da agulha para a injeção. Diante dessas considerações, a injeção pela veia cardinal em desenvolvimento foi estabelecida como parâmetro para o projeto, já que essa abordagem demonstrou resultados favoráveis e minimizou as complicações associadas aos outros locais testados.

Considerando os experimentos conduzidos para avaliar a eficiência de transfecção em embriões utilizando diferentes concentrações do vetor contendo o gene repórter, observou-se que as taxas de malformações e mortalidade foram relativamente baixas para ambos os protocolos (Figura 1). Essas taxas indicam que a técnica é, em geral, bem tolerada pelos embriões. Cabe destacar que as malformações observadas, incluindo torções do eixo embrionário e espessamento de vasos sanguíneos, parecem estar fortemente associadas a erros de manipulação experimental durante as injeções, de forma com que essas não parecem ser atribuíveis aos componentes da solução de injeção.



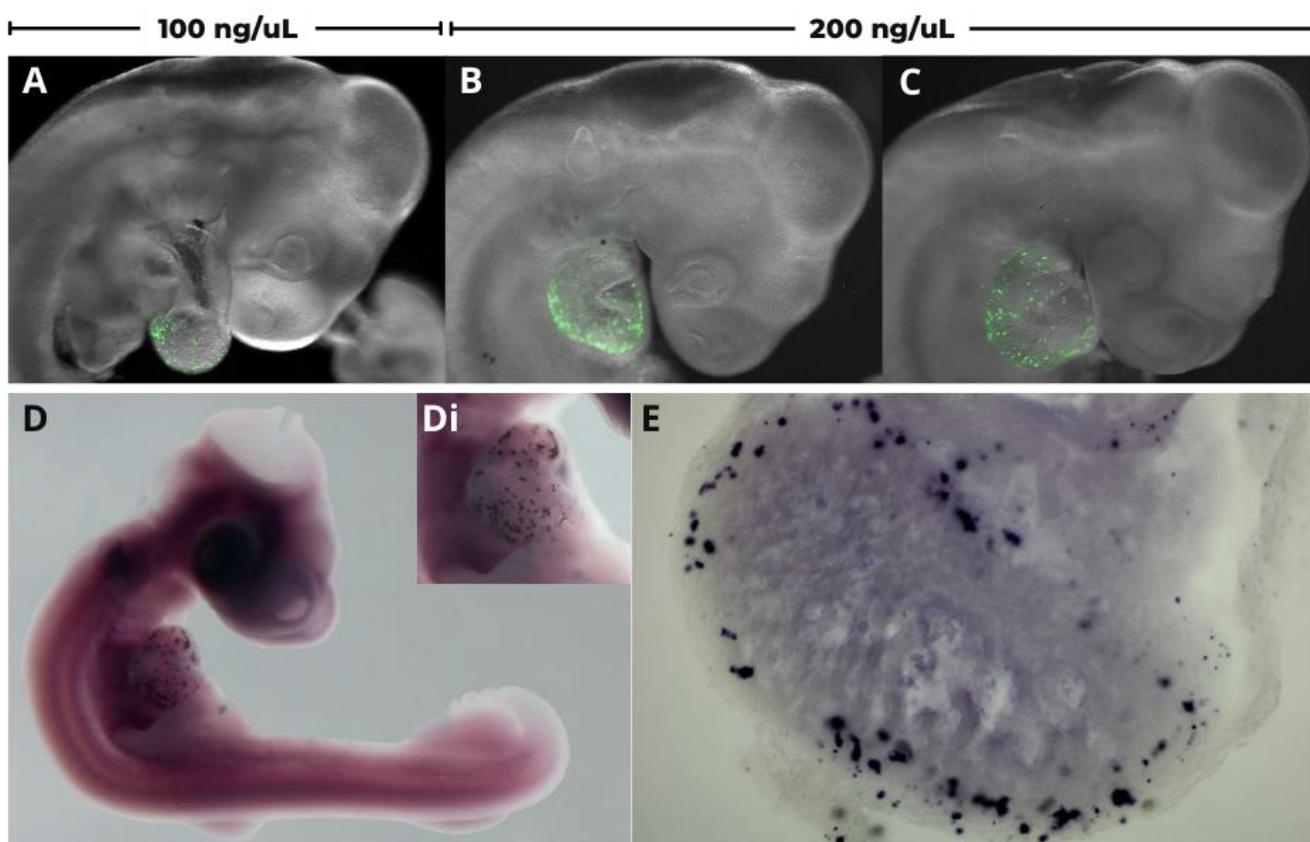
**Figura 1.** Relação entre os protocolos utilizados e as taxas de sobrevivência, eficiência de transfecção e malformações.

Além disso, a expressão do gene repórter GFP foi detectada na maioria dos embriões vivos avaliados (Tabela 1, Figura 1). O padrão de expressão revelou-se principalmente na forma de grânulos fluorescentes distribuídos pelo coração. Os embriões submetidos ao protocolo com 200 ng de pCMV-eGFP por  $\mu\text{L}$  apresentaram maior eficiência de transfecção em comparação com os embriões transfectados com 100 ng de pCMV-eGFP por  $\mu\text{L}$ , evidenciada pela maior área de cobertura dos grânulos fluorescentes no coração e pelo tamanho mais robusto desses agrupamentos (Figura 2 A – C).

**Tabela 1.** Relação entre o protocolo utilizado e o número de embriões utilizados, vivos, transfectados e malformados.

Parâmetro (n°)   Protocolo utilizado	100 ng/ul	200 ng/ul
Embriões utilizados	15	34
Vivos	9	28
Transfectados	5	21
Malformados	1	5

Após a determinação da concentração otimizada da construção repórter, utilizamos a hibridação *in situ* (HIS) para a marcação estável das células cardíacas transfectadas. Os resultados mostraram um padrão de expressão do gene repórter semelhante ao observado nos ensaios de fluorescência. As áreas de transfectadas concentraram-se principalmente nas camadas superficiais do coração, como o pericárdio e parte do miocárdio, sugerindo que a técnica de transfecção possui uma especificidade maior para essas camadas nas condições experimentais estabelecidas (Figura 2 D - E).



**Figura 2.** A, B, C - Resultados da expressão de GFP nos corações de embriões de galinha para as duas concentrações de pCMV-eGFP testadas. D - Resultados da hibridação *in situ* realizada com os embriões transfectados pelo protocolo otimizado. Di - Padrão de marcação em grânulos no coração. E - Corte do coração após a hibridação *in situ*, demonstrando marcação periférica.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que a transfecção de células cardíacas de embriões de galinha utilizando o protocolo desenvolvido é uma técnica viável, evidenciado pelas altas taxas de sobrevivência, baixas taxas de malformações e pela ampla expressão do gene repórter no tecido cardíaco. Esses achados sugerem que

a técnica é uma alternativa promissora para análises funcionais de genes em estudos de desenvolvimento cardíaco e malformações congênitas. Como próximos passos, pretendemos empregar essa metodologia em ensaios de superexpressão com genes de interesse, visando a caracterização de sua função no desenvolvimento cardíaco normal e patológico.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

- ALVARES, L. E. et al. Chicken dapper genes are versatile markers for mesodermal tissues, embryonic muscle stem cells, neural crest cells, and neurogenic placodes. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 5, p. 1166–1178, maio 2009.
- MADRUGA, I. et al. Associated Factors with Congenital Heart Disease in the Most Populated State of Brazil Between 2010 and 2018. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 36, 2023.
- TAKASE, Y.; TAKAHASHI, Y. Blood flow-mediated gene transfer and siRNA-knockdown in the developing vasculature in a spatio-temporally controlled manner in chicken embryos. **Developmental Biology**, v. 456, n. 1, p. 8–16, 1 dez. 2019.
- TOMIZAWA, R. R.; TABIN, C. J.; YUJI ATSUTA. *In ovo* electroporation of chicken limb bud ectoderm. **Developmental Dynamics**, v. 251, n. 9, p. 1628–1638, 3 maio 2021.
- VAN DER LINDE, D. et al. Birth Prevalence of Congenital Heart Disease Worldwide. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 21, p. 2241–2247, nov. 2011.
- WITTIG, J.; MÜNSTERBERG, A. The Early Stages of Heart Development: Insights from Chicken Embryos. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 3, n. 2, p. 12, 5 abr. 2016.
- YIP, B. H. Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 839, 30 maio 2020.