

encontrada por WB em células descongeladas, entretanto foi localizada mediante imuno-histoquímica nos tecidos fixados, em nível perinuclear e membrana no estroma e tecido glandular. Um padrão similar foi encontrado para a proteína Sox2 nas amostras de tecidos. Por sua parte, SOX2 foi observado no estroma, fibroblastos, glândulas e células periglandulares em nível nuclear e perinuclear. Os marcadores mesenquimais CD44 e CD 117 foram detectados por qPCR nos tecidos e células, porém a proteína foi encontrada apenas no tecido (WB). Os cultivos primários foram capazes de aderir-se ao plástico, apresentaram morfologia similar a fibroblastos e se diferenciaram *in vitro* nas linhagem condrogênica e osteogênica, porém não na linhagem adipogênica, o que foi descartado através de coloração e RT-qPCR. As unidades formadoras de colônias foram observadas para a linhagem celular avaliada, com uma média de 5,3 colônias em 3 réplicas (eficiência de clonogenicidade: 0,63%) e um tempo de duplicação de 30 horas. Nossos resultados indicam que o endométrio bovino possui células-tronco/progenitoras indiferenciadas com capacidade de auto-renovação, formação de colônias, expressão de proteínas e genes específicos de células tronco e diferenciação em pelo menos duas linhagens mesodermis. Estes resultados estão de acordo com nossos resultados previamente encontrados no estudo do tecido endometrial bovino durante as fases lúteas (inicial e tardia) do ciclo estral.

Este estudo foi financiado através da Bolsa Conicyt de doutorado nacional n°21150425 pelo Governo do Chile.
Palavras-chave: Células-tronco; endométrio; bovino

SBTE 228 Clonagem, transgênese e células-tronco
Número de submissão 1599

Transfecção gênica de células primárias de fibroblastos bovinos utilizando nanotubos de carbono multicamadas carboxilados

Michele Munk Pereira¹; Humberto de Mello Brandão²; Rafaella de Souza Salomão Zanette¹; Carolina Capobianco Romano Quintão²; Eliza Diniz de Souza³; Leonara Beatriz Fayer Almeida¹; Luiz Orlando Ladeira⁴; Luiz Sérgio de Almeida Camargo²

1. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil; 2. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; 3. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil; 4. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

A inserção de DNA dentro de células de mamíferos é uma importante fase na produção de animais transgênicos. Contudo, células de linhagens primárias são difíceis de serem transfectadas (Gresh et al., 2012. *Methods Mol Biol*, 801:65-74). Recentemente, os nanotubos de carbono têm sido explorados como um novo e eficiente sistema de entrega gênica devido a sua estrutura e propriedades únicas (Cheung et al., 2010. *Adv Drug Deliv Rev*, 62: 633-649). Entretanto, ainda não foi avaliado seu potencial de transfecção de linhagens primárias de células fibroblásticas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial uso de nanotubos de carbono multicamadas carboxilados (MWCNTs-COOH) como um novo vetor não-viral para transfecção de linhagens primárias de fibroblastos bovinos. MWCNTs-COOH foram complexados ao DNA plasmidial contendo o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) para formar o complexo MWCNT-COOH/pDNA. Fibroblastos bovinos coletados de vacas Gir foram congelados a -80°C. As células armazenadas na 2ª passagem foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM (1x10⁴ células/poço) suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubados a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os fibroblastos foram transfectados com complexos MWCNTs-COOH/pDNA (relação 5:1) ou polietilenoimina (PEI) 25KDa (relação 1:1) (Controle). A expressão do gene GFP nas células transfectadas foi examinada por citômetro de fluxo equipado com laser de argônio de 488 nm e filtro de emissão 530/30 nm "bandpass" (detector FL1) (FACScalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA) e a detecção do gene pelo ensaio de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). A análise estatística foi realizada por ANOVA e as médias comparadas pelo teste Student Newman Keus. A análise por citometria de fluxo demonstrou que não houve diferença de eficiência de transfecção entre MWCNT-COOH e PEI (P>0,05). Foram observados que 3,30% ± 0,36% dos fibroblastos positivos para GFP com MWCNT-COOH e 3,96% ± 1,42% com PEI. Para verificar os resultados obtidos por citometria de fluxo, foi realizada a análise por PCR em tempo real para avaliar a presença do gene GFP nos fibroblastos. A banda do produto do gene GFP também foi detectada por eletroforese, confirmando a presença do transgene nos fibroblastos transfectados. Nossos resultados demonstram que os MWCNTs-COOH podem ser uma alternativa de vetor gênico para a transfecção de linhagens primárias de fibroblastos bovinos.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono; carreadores gênicos; transgênico

SBTE 229 Clonagem, transgênese e células-tronco
Número de submissão 1651

Blastocistos bovinos produzidos a partir de genoma de espermatozoides clonado e ovócitos maduros ou pré-ativado

Mariana Suvá; Lucia Natalia Moro; Daniel Salamone
Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Clonagem do genoma do espermatozoide tem um grande potencial na produção de gado. A disponibilidade de várias cópias de um único genoma de espermatozoide permitiria o rastreamento genético para características produtivas valiosas. Além disso, vários ovócitos da mesma ou de diferentes doadoras poderiam ser fertilizados com exatamente o mesmo genoma paterno.