

## SBTE 217 CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

**Reversibilidade da inibição do ciclo celular induzida por extratos de azadirachta indica em fibroblastos bovinos****N.C. Rabelo<sup>1</sup>; C.C. Quintão<sup>1</sup>; S.G. Brito<sup>1</sup>; N.B.R. Raposo<sup>2</sup>; E.D. Souza<sup>1</sup>; J.H.M. Viana<sup>1</sup>; L.S.A. Camargo<sup>1</sup>**<sup>1</sup>.EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; <sup>2</sup>.Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.**Palavras-chave:** TNCS; inibição celular; reprogramação gênica.

Dentre os vários desafios encontrados na técnica de TNCS, a reprogramação gênica é o ponto mais crítico do processo, pois o núcleo precisa assumir um padrão de expressão gênica de um embrião recém-fertilizado. A utilização de células doadoras de núcleo estacionadas nas fases G0/G1 do ciclo celular é importante para uma correta reprogramação. Extratos do vegetal *Azadirachta indica* (Nim) apresentaram potencial para inibir o ciclo de fibroblastos bovinos, porém a reversibilidade dessa inibição é necessária para o reinício da mitose do zigoto reconstruído por TNCS. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a reversibilidade do efeito de inibição provocado pelos extratos do vegetal. Fibroblastos bovinos foram cultivados e expostos às concentrações dos extratos que possuem maior potencial inibitório, de acordo com estudo prévio (Rabelo *et al.*, 2011. *Acta Sci. Vet.* 39[Supl.]:S338), conforme segue: 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL por 24 h, para o etanólico, e 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL por 12 h e 50µg/mL, 100µg/mL por 24 h, para o hexânico. Foram realizadas três repetições, em triplicata, para cada tratamento. Simultaneamente, foi preparado um controle com soroprivação (ausência de extrato, células com 0,5% de soro por três dias). A reversibilidade da inibição do ciclo celular foi avaliada em Citômetro de Fluxo (Facs Callibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) através da determinação da porcentagem de células em cada estágio do ciclo, em 0, 12, 24 e 36 h após a remoção dos extratos. Considerou-se retorno ao ciclo celular a redução da proporção de células estacionadas em G0/G1 após a remoção dos extratos. Os histogramas sobrepostos foram avaliados utilizando-se o programa WinMDI, para determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S e G2) e a análise estatística realizada pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Houve uma redução na proporção de células nos estágios G0/G1 após 12 h da remoção do contato com o extrato etanólico na concentração de 100µg/mL, mostrando o retorno ao ciclo celular de parte das células. A soroprivação também apresentou uma diminuição da proporção de células em G0/G1, entretanto, isto ocorreu 24 h após a remoção desta condição. Os demais tratamentos, incluindo aqueles com extrato hexânico, não apresentaram alteração na porcentagem de células em G0/G1 em 0, 12, 24 e 36 h após a remoção dos extratos. Conclui-se que a inibição do ciclo celular com 100µg/mL de extrato etanólico de Nim pode ser revertida após 12 h da remoção do contato, ocorrendo mais rápido do que a soroprivação, e, portanto, é a concentração mais indicada dentre as testadas para fibroblastos bovinos.

## SBTE 218 CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

**Método simples e eficiente para produção de embriões bovinos transgênicos****P.S. Monzani<sup>1</sup>; S. Guemra<sup>1</sup>; P.R. Adona<sup>1</sup>; F.F. Bressan<sup>2</sup>; F.V. Meirelles<sup>2</sup>; M.S. Miranda<sup>3</sup>; O.M. Ohashi<sup>3</sup>**<sup>1</sup>.Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, Brasil; <sup>2</sup>.Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>3</sup>.Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.**Palavras-chave:** embriões; transgênico; FIV.

Técnicas para produção de embriões bovinos transgênicos tais como microinjeção pronuclear, clonagem, injeção lentiviral perivitelínica ou ICSI, requerem instrumentos e metodologias específicas, limitando o uso da técnica a laboratórios muito equipados e mantendo o custo elevado. Aqui apresentamos uma metodologia simples e eficiente para produção de embriões bovinos transgênicos, baseada na produção de embrião pela FIV, seguida pela transdução do zigoto com lentivírus. Lentivírus foram produzidos em células HEK 293 através de lipofecção, utilizando os vetores lentivirais do kit ViraPower Lentiviral Packaging Mix, o FUGW e o pLenti-pβcas5-hINS. O último vetor foi construído pela modificação do pLenti6.2-GW/EmGFP, cujo promotor PCMV foi substituído pelo promotor da β-caseína bovino, contendo 5.335-kbp, e o gene humano da preproinsulina foi introduzido no local do gene da EmGFP. Após a produção lentiviral, os vírus foram concentrados por precipitação com PEG. Oócitos foram aspirados de ovários provenientes de matadouro, maturados e fecundados *in vitro* seguindo protocolo padrão. Após 18 horas da FIV, as células do cumulus foram removidas com hialuronidase e os zigotos divididos em três grupos. No primeiro, a zona pelúcida (ZP) foi totalmente digerida com pronase, no segundo a ZP foi parcialmente digerida e no terceiro foi mantida. Os embriões foram cultivados em sistema well of the well em meio SOF com solução lentiviral (5% do volume total da gota) por 7 dias. Os blastocistos obtidos foram avaliados quanto à emissão de fluorescência da GFP (vetor FUGW) e observou-se 100% de eficiência de transgenia dos embriões para os três grupos avaliados. O grupo sem a ZP apresentou maior intensidade de fluorescência, sugerindo maior inserção do transgene, porém com baixa qualidade dos embriões. Os grupos com ZP e com digestão parcial da ZP não apresentaram diferenças visuais quanto à emissão de fluorescência. A seleção dos embriões transgênicos transduzidos com lentivírus que continha o gene da insulina foi realizada pela adição de blasdicidina (6µg/mL), no terceiro dia de desenvolvimento. Os blastocistos obtidos foram avaliados individualmente por PCR quanto ao gene de resistência à blasdicidina e observou-se 100% de eficiência nos três diferentes grupos. Esta metodologia se mostrou eficiente para produção de embriões bovinos transgênicos e apresenta vantagens sobre as metodologias utilizadas atualmente. Estudos posteriores serão realizados para determinação da quantidade de cópias inseridas e para a avaliação do estabelecimento de gestações.