

DETECÇÃO DO RNA MENSAGEIRO DO GENE IGF2R E DESENVOLVIMENTO DE UMA RT-PCR SEMIQUANTITATIVA PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE EM FIBROBLASTOS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Franco, Maurício Machaim; Souza, Carlos José Hoff de; Rumpf, Rodolfo; Dode, Margot Alves Nunes; Melo, Eduardo de Oliveira

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Av. W 5 Norte Final, Parque Estação Biológica - CEP 70770-900, Brasília-DF

mfranco@cenargen.embrapa.br

Palavras-chave: IGF2R, fibroblastos, bovinos

As técnicas de reprodução animal como inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro*, clonagem e transgenia associadas a caracterização genética são ferramentas indiscutivelmente úteis à pecuária moderna pois auxiliam na identificação, seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores. Vários fatores afetam a eficiência dessas técnicas, como a manipulação das células, ovócitos e embriões, composição dos meios de cultivo e maturação dentre outros. Estes fatores podem ser os responsáveis pelas diferenças na eficiência de produção entre embriões TE, FIV ou clones gerados por transferência nuclear. Dentre várias causas possíveis pode-se considerar as alterações nos padrões de metilação no DNA e consequente alteração na expressão de genes *imprinted* tanto em células como em embriões. Assim, é importante focar a expressão gênica para compreender melhor o efeito desses fatores sobre padrões de metilação no DNA e expressão de genes *imprinted* envolvidos no desenvolvimento embrionário, fetal, da placenta e neonatal almejando melhores índices nas técnicas de reprodução. Este trabalho teve como objetivos detectar a expressão de gene IGF2R em fibroblastos isolados da pele de bovinos adultos cultivados *in vitro* e desenvolver uma RT-PCR semiquantitativa para fornecer esta ferramenta a estudos de expressão gênica. As células, aproximadamente 10^6 , confluentes e na 7ª passagem, foram tripsinizadas, lavadas com meio de cultivo e Tris-EDTA e peletadas. Foi acrescido ao *pellet* 1 mL de *Trizol Reagent*¹ (Gibco) para extração de RNA total seguindo recomendações do fabricante. 1 µg do RNA total foi usado para a produção de cDNA utilizando 100 U da enzima *Superscript*² (Invitrogen) e 15 pmoles de *primers* T₁₁NN. Para a detecção da expressão do gene foram usados 2,0 µL do cDNA, 10 pmoles de cada *primer*, 2 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 400 µM de dNTPs em um volume final de 20 µL. O programa utilizado foi como se segue: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54°C por 40 segundos e 72°C por 45 segundos terminando com uma extensão final de 72°C por 15 minutos. Para a RT-PCR semiquantitativa foram usados 5,0 µL do cDNA, 2,5 pmoles de cada *primer* para o gene da β -actina, 10 pmoles de cada *primer* para o gene IGF2R, 2 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 800 µM de dNTPs. O programa foi o mesmo descrito acima, mas utilizando 59°C para anelamento. Os 2 pares de *primers* foram colocados no mesmo tubo de reação, dando maior confiabilidade à técnica. Essas condições de reação permitiram uma eficiente detecção da expressão do gene da β -actina (usado como controle constitutivo) e do gene IGF2R, além da otimização da RT-PCR semiquantitativa, uma importante ferramenta a ser utilizada em estudos de expressão gênica envolvendo ou não *imprinting* genômico.