

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES CLONES A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE BOVINO ADULTO TRANSFECTADOS OU NÃO

Iguma, Lilian Tamy^{1,2}; Melo, Eduardo Oliveira²; Sousa, Regivaldo Vieira²; Campos, Haroldo da Costa Ferreira^{2,3}; Franco, Maurício Machaim²; Dode, Margot Alves Nunes²; Rech, Elíbio²; Rumpf, Rodolfo²

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília – DF. ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF. ³Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília – DF
rodolfo@cenargen.embrapa.br

Palavras – chave: bovino, clonagem, transgênico

A associação das biotecnologias de transferência nuclear (TN) e transfecção de células animais apresenta aplicações potenciais de amplo e importante impacto, principalmente nas áreas de medicina e farmácia. Além de ser a maneira mais eficiente para produção de bovinos transgênicos. Para isto, as células doadoras de núcleos necessitam ser transfectadas e selecionadas. Os efeitos do longo período de cultivo *in vitro* e das manipulações genéticas de células doadoras foram pouco estudados até então. Este trabalho objetivou comparar a eficiência da TN utilizando fibroblastos isolados da orelha de uma novilha clone de 14 meses de idade (FOC) vs. a mesma linhagem transfectada (lipofecção) com vetor de expressão contendo uma sequência que codifica para cadeia leve de um anticorpo monoclonal humano anti-câncer (scFv) sob controle do promotor constitutivo CMV (citomegalovírus) (TFOC). Ovócitos obtidos de abatedouro foram maturados *in vitro* por 19-21h e, posteriormente, enucleados. Seguiu-se a reconstrução embrionária utilizando-se FOC ou TFOC selecionados com antibiótico G418 e com comprovação da presença do transgene por PCR. A eletrofusão dos complexos carioplasto-citoplasma (CCC's) ocorreu em manitol 0,28M com 2 pulsos DC de 2,1 kV/cm/30 μ s. De 3-5 horas pós-eletrofusão (p.e.), procedeu-se a ativação artificial com ionomicina 5 μ M/5 min e 6-DMAP 2mM/5 horas. Os possíveis zigotos foram co-cultivados *in vitro* com células da granulosa em meio SOFaaci acrescido 5% SFB. Foram transferidos 1, 2 ou 3 blastocistos por vaca receptora sincronizada. As diferenças entre os grupos foram verificadas pelo teste de χ^2 . Para efeito de controle, 246 ovócitos foram ativados partenogeneticamente, resultando em 69,10% de clivagem e 40,65% de blastocistos. Partindo de 239 e 409 ovócitos manipulados, foram reconstruídos 149 e 252 embriões com FOC e TFOC, respectivamente. Destes, observou-se que 116 (77,85%) e 178 (70,63%) dos CCC's haviam se fundido, nos grupos FOC e TFOC, respectivamente. As taxas de clivagem e blastocisto foram de 67,24% (n=78/116) e 30,17% (n=35/116) para o tratamento com FOC e de 67,97% (n=121/178) e 24,15% (n=43/178) quando utilizou-se TFOC, respectivamente. Ao exame ultrassonográfico 30-35 dias pós-inovulação (p.i.) de embriões FOC, constatou-se que 14/17 (82,35%) receptoras encontravam-se vazias, 1/17 (5,88%) em processo de reabsorção e 2/17 (11,76%) prenhes. Com relação a embriões TFOC, foram avaliadas 11 vacas, das quais 8 (72,72%) apresentavam-se vazias, 2 (18,18%) em processo de reabsorção e 1 (9,09%) prenhe. Quatro receptoras transferidas com blastocistos TFOC não foram examinadas, pois encontravam-se com menos de 30 dias p.i. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre dados verificados nas TN's de FOC e TFOC. Esses resultados sugerem que, nas condições deste experimento, a transfecção não comprometeu o desenvolvimento de embriões TN. Pode-se ainda sugerir que o longo tempo e as muitas passagens no cultivo *in vitro* das células transfectadas não tiveram efeito adverso na eficiência *in vitro* da TN.

Apoio Financeiro: Embrapa - Cenargen / CNPq