

P.A

SP
4898
P.156

Clonagem, transgênes e células-tronco

RESUMO 193

HANDMADE CLONING EM CAPRINOS

Alcântara Neto, A.S.¹; Carneiro, I.S.²; Pereira, A.F.¹; Feltrin, C.²; Ferreira, J.S.¹; Lima-Verde, J.B.²; Bertolini, L.R.²; Freitas, V.J.F.¹; Bertolini, M.²

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE; ²Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, CE - Brasil
E-mail: netosa@gmail.com

A tecnologia da clonagem animal tem sido o foco de interesse de muitos grupos de pesquisa em todo mundo. Apesar dos esforços, a clonagem continua ineficiente, especialmente quando aplicada a outras espécies, que não a bovina. Recentemente, métodos alternativos de clonagem, como o *handmade cloning* (HMC), têm simplificado o processo, diminuindo também o tempo e o custo para a formação de pessoal e para a produção de embriões. O objetivo deste estudo foi adaptar o procedimento de *handmade cloning* para caprinos, baseado em nossos procedimentos em bovinos (Ribeiro et al., 2009, Cloning Stem Cells, 11:377-386), visando a produção de embriões clones transgênicos. Complexos *cumulus*-ócito caprinos (CCOs) oriundos de ovários de abatedouro foram maturados *in vitro* em meio composto de meio de manipulação (MM: TCM199, 0,022 µg/mL de piruvato de sódio, 10.000 UI de penicilina, 10.000 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 25 µg/mL de anfotericina B) suplementado com 10 µg/mL de EGF, 5 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH, 1 µg/mL de E₂, 100 µM de cisteamina e 10% de soro de cabra em estro (SCE), por 20 h a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada. Após a remoção de células do *cumulus* e seleção do corpúsculo polar (CP), óocitos maturados foram expostos a 0,25% de protease para a remoção da zona pelúcida, seguido da lavagem em soro fetal bovino puro (SFB) e várias lavagens em MM + 10% de SFB. Óocitos sem zona foram bisseccionados manualmente em 2,5 µg/mL de citocalasina B, com os hemi-citoplastos enucleados sendo selecionados sob luz ultravioleta. Em seguida, dois hemi-citoplastos expostos à fitohemoaglutinina foram aderidos a um único fibroblasto proveniente de cultivo celular primário entre a 2ª e 4ª passagem, em elevada confluência (>95%), obtido a partir de uma biópsia cutânea de uma cabra transgênica para o hG-CSF. As estruturas reconstruídas foram eletrofusionadas por dois pulsos de corrente contínua de 1,1 kV/cm por 5 µs (-26 h pós-MIV), após uma breve exposição a um pulso de pré-fusão de corrente alternada de 7,0 V. As estruturas fusionadas foram ativadas em ionomicina/6-DMAP para serem individualmente cultivadas *in vitro* no sistema WOW em meio SOFaa + 2% de SFB + 0,3% de BSA, a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ por sete dias. Em três repetições, a taxa de maturação, com base na seleção dos CP, foi de 84,6% (549/649), com uma taxa de fusão atingindo 83,2% (139/167). A taxa de clivagem foi de 85,4% (105/123), com 17,1% dos embriões atingindo estádios transferíveis (8 mórulas compactas e 13 blastocistos/105) no Dia 7 de desenvolvimento. Esses resultados preliminares são semelhantes aos relatados por outros autores utilizando o procedimento clássico de clonagem. Em conclusão, a clonagem manual (HMC) parece ser uma alternativa eficaz para a produção de embriões clones transgênicos caprinos. Estudos adicionais encontram-se em andamento visando o nascimento de clones viáveis. Projeto financiado pelo CNPq, FUNCAP e FINEP/MCT (RECODISA).

RESUMO 194

EFEITO DA MITOMICINA C SOBRE A VIABILIDADE E CICLO CELULAR DE FIBROBLASTOS ADULTOS BOVINOS APÓS DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO

Assunção, C.M.¹; Grázia, J.G.V.¹; Campos Jr., P.H.A.²; Pereira, M.M.¹; Azevedo, A.L.²; Quintão, C.C.¹; Viana, J.H.M.¹; Camargo, L.S.A.¹

¹Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; ²Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG;
³Laboratório Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG - Brasil
E-mail: carol_marinho@yahoo.com.br

A derivação de células embrionárias bovinas (CTE-like) é um grande desafio, pois os protocolos de cultivo utilizados são muito divergentes e ineficientes. Uma forma de melhorar essa metodologia seria a utilização de células-suporte espécie-específicas. A mitomicina C (MMC) é um agente antiproliferativo que inibe o ciclo principalmente nas fases S e G₂/M mas que pode causar citotoxicidade. O efeito da MMC sobre fibroblastos bovinos derivados de animais adultos (FBA) é pouco conhecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para inativação mitótica de FBA com MMC, visando sua futura aplicação na derivação de CTE-like bovinas. Fibroblastos bovinos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubados a 38,5°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Após atingirem 60% de confluência, as células foram tratadas com MMC (10 µg/ml) sob diferentes tempos de exposição: 0h (controle), 2h, 3h, 4h e 5h. Posteriormente, os fibroblastos foram analisados em citômetro de fluxo para avaliação do ciclo celular (G₁/G₀, S, G₂/M) e viabilidade. Para análise do ciclo celular, os fibroblastos foram fixados (etanol 70%) a 4°C por 2,5 h. Posteriormente, as células foram tratadas com RNase A (100 µg/mL) por 10 min, e coradas com iodeto de propídio (IP) (50 µg/mL) 5 min antes da leitura. A viabilidade foi avaliada em células não-fixadas coradas com IP (50 µg/mL) durante 30 min a 37°C. Foram realizadas três repetições em triplicatas cada uma. A estatística foi feita por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. Na análise do ciclo celular observou-se aumento (p<0,05) dos picos nas fases S e G₂/M, e diminuição de G₁/G₀ em todos os tempos de exposição à MMC comparados ao controle. Não houve diferença (p>0,05) na proporção de células na fase S entre os tempos de exposição de 2h (30,64±3,05%), 3h (30,85±4,31%) e 4h (29,79±4,81%). A proporção de células na fase G₁/G₀ foi semelhante (p>0,05) entre 2h (42,42±3,29%) e 3h (44,82±4,24%) enquanto o tempo de exposição de 3h foi semelhante (p>0,05) ao de 4h (47,38±5,39%). O tempo de 5h foi o que apresentou maior proporção (p<0,05) de células em G₁/G₀ (51,34±3,67%). Contudo, com 2h houve maior quantidade de células concentradas em S (30,64±3,05%) e G₂/M (22,90±2,59%) do que nos outros tempos de exposição, enquanto o tempo 5h mostrou a menor (p<0,05) proporção de células em S (22,576±3,21%). Observou-se uma menor proporção (p<0,05) de células viáveis nos tempos de 2h (89,67±3,78%), 3h (89,87±2,07%), 4h (88,28±3,82%) e 5h (87,122±2,52%) em relação ao controle (93,592±2,12%), porém não houve diferença entre os tempos de exposição à MMC. Em conclusão, a MMC inibe a proliferação celular de FBA, com o tempo de exposição de 2h sendo o mais efetivo em manter fibroblastos bovinos em S e G₂/M, mas a MMC diminui a viabilidade dessas células na concentração avaliada.

RESUMO 195

EXPRESSÃO DE GFP EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS NA PLACENTA DE CLONES BOVINOS TRANSGÊNICOS

Barreto, R.S.N.¹; Bressan, F.F.¹; Oliveira, L.J.¹; Migliano, M.A.¹; Pereira, F.T.V.²; Meirelles, F.V.¹

¹Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, ZAB, FZEA-USP, Pirassununga, SP; ²Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, VCI, FMVZ-USP, São Paulo, SP - Brasil
E-mail: rodrigobarreto@usp.br

A migração das células trofoblásticas gigantes binucleadas (CTGs) para o tecido materno, durante a prenhez, já foi descrito em muitas espécies incluindo os bovinos. Após a migração essas células fusionam com células do epitélio materno para facilitar o transporte de proteínas fetais para o lado materno da placenta. As CTGs são descritas por expressarem proteínas específicas, tais como, lactogênio placentário e glicoproteínas associadas a gestação. Em placentas de clones bovinos um aumento do número de CTGs acompanhado a muitas outras anormalidades placentárias foi reportado. Neste trabalho foi usado o modelo de embrião clonado transgênico para GFP para avaliar a migração de células fetais na placenta bovina. Amostras de placentônio, membranas e endométrio intercaruncular de cornos uterinos prenhes e não prenhes foram obtidas de gestações de embriões clonados expressando GFP aos 60 (n=3) e 90 (n=3) dias. As amostras foram preservadas em PFA 4% tamponado e embedido em parafina para imunohistoquímica (IHC) ou congeladas em nitrogênio líquido para western blotting (WB), PCR em tempo real e microscopia de fluorescência. Por meio desse modelo esperávamos observar a migração das CTGs para os tecidos maternos. Entretanto não foram observadas células positivas para GFP no lado materno. A análise de IHC mostrou marcação negativa para GFP nas CTGs e positiva nas células trofoblásticas em todas as amostras analisadas. Na análise por WB, como esperado a GFP estava presente no placentônio e nas membranas placentárias. Também observamos presença da GFP nas amostras de endométrio intercaruncular em ambos os cornos uterinos. A ausência da GFP nas CTGs sugere um silenciamento do gene GFP em resposta ao perfil altamente específico de síntese proteica. A presença da GFP no endométrio intercaruncular de ambos os cornos uterinos pode ter sido gerado pela alta solubilidade da GFP ou por mecanismos que permitem a permeabilidade de proteínas fetais para o útero durante a gestação em vacas. Apoio Financeiro: FAPESP