

P.A  
16

SP  
4899  
P.156

RESUMO 196

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONES BOVINOS A PARTIR DE OÓCITOS OBTIDOS DE MATUREZAÇÃO *IN VIVO*

Camargo, L.S.A.<sup>1</sup>; Serapião, R.V.<sup>2</sup>; Quintão, C.R.C.<sup>1</sup>; Pereira, M.M.<sup>1</sup>; Oliveira, A.P.<sup>3</sup>; Sales, J.N.S.<sup>4</sup>; Freitas, C.<sup>1</sup>; Iguma, L.T.<sup>1</sup>; Viana, J.H.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; <sup>2</sup>Pesagro, Rio de Janeiro, RJ; <sup>3</sup>Epmig, Juiz de Fora, MG; <sup>4</sup>USP, São Paulo, SP - Brasil  
E-mail: Camargo@cnpqg.embrapa.br

Um componente importante na transferência nuclear com células somáticas é o citoplasma do oócito. Assim, avaliou-se a competência de oócitos maturados *in vivo*, obtidos de punção folicular (OPU) de doadoras superestimuladas hormonalmente, para produção de embriões clones. Foram estabelecidos dois grupos: G1 - oócitos maturados *in vitro* obtidos de doadoras (n=8 coletas) não estimuladas e G2 - oócitos de doadoras (n=8 coletas) superestimuladas com FSH (Folltropin, Bioniche, Ontario, Canadá) e maturação *in vivo* induzida com análogo ao GnRH (Gestran, ARSA, Buenos Aires, Argentina). No G2, doadoras receberam implante auricular de norgestomet (Crestar, Intervet, Boxmeer, Holanda) e injeção i.m. de 5 mg valerato de estradiol e 3 mg norgesmet (dia 0=D0). No D4, administraram-se i.m. 180 mg FSH em oito doses decrescentes de 12/12h. No D6 à tarde e D7 pela manhã administraram-se i.m. 500µg cloprostenol sódico (Ciosin, Intervet). O implante foi removido no D7 e administrado i.m. 50 µg de Gestran após 12h. A OPU ocorreu 18h após a administração do Gestran. Os oócitos do G1 foram maturados *in vitro* por 17-18h e os oócitos do G2 encaminhados para a enucleação. Em ambos os grupos, os oócitos maturados foram desnudados e expostos ao Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, EUA) e citocalasina (Sigma) antes da enucleação. Embriões do G1 (n=52) e G2 (n=28) foram reconstruídos com células somáticas de fêmea adulta raça Gir, fusionados com dois pulsos de 2,4 kV/cm de 30 µseg, e ativados com ionomicina (Sigma) seguido de 6-DMAP (Sigma). Embriões foram cultivados em CR2aa com 2,5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil) em 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. Avaliou-se clivagem com 72h e blastocistos com 168h pós-ativação. Número total de oócitos recuperados e de oócitos viáveis por doadora foi avaliado por análise da variância e as taxas de oócitos viáveis, fusão, clivagem e blastocisto analisados por qui-quadrado. Não houve diferença (P>0,05) no número total de oócitos (16,25±3,2 e 13,75±3,9) e de oócitos viáveis (12,7±2,8 e 7,75±3,6) obtidos entre G1 e G2, porém a taxa de oócitos viáveis foi maior (P<0,05) no G1 (78,46%) do que no G2 (56,36%). Observou-se uma maior expansão das células do cumulus no G2, causando maior dificuldade na procura e identificação do complexo cumulus-oócitos. Não houve diferença (P>0,05) nas taxas de fusão (G1=69,2% e G2=57,1%), de clivagem (G1=77,7% e G2=73,3%) e de blastocistos (G1=25,0% e G2= 20,0%). A superestimulação com FSH seguido de GnRH para indução da maturação *in vivo* produz oócitos com capacidade de gerar embriões clones semelhante aos dos oócitos maturados *in vitro*, contudo, dificulta identificação e reduz proporção de oócitos viáveis disponíveis para enucleação. Apoio financeiro: CNPq e Fapemig.

RESUMO 197

USO DE MEIO SUPLEMENTADO COM SFB E KNOCKOUT SERUM REPLACEMENT® PARA A DERIVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGOS C57BL/6J/EGFP

Campanha, B.S.C.<sup>1</sup>; Oliveira, C.S.<sup>2</sup>; Souza, D.M.<sup>1</sup>; Godói, C.P.<sup>1</sup>; Fernandes, H.<sup>1</sup>; Ribeiro-Paes, J.T.<sup>1</sup>; Garcia, J.M.<sup>2</sup>; Nogueira, M.F.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micromanipulação Embrionária Prof. Marcelo F. G. Nogueira, Depto. de Ciências Biológicas, FCL/UNESP, Assis, SP; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologias da Reprodução Prof. Joaquim M. Garcia, Depto. de Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP - Brasil  
E-mail: bru\_campanha@yahoo.com.br

Células tronco embrionárias (CTE) têm sido utilizadas nas tentativas de obtenção de tecidos específicos ou mesmo de indivíduos, devido à sua pluripotencialidade. Por esse motivo, o estabelecimento de linhagens estáveis de CTE é desejável. Entretanto, há linhagens de camundongos ditas refratárias à derivação de CTE e/ou geração de animais quiméricos a partir destas (p.ex., C57BL/6). A complementação do meio de cultura com SFB, na derivação das CTE, pode influenciar a potencialidade de derivação e/ou a utilização dessas linhagens em ensaios de complementação tetraplóide (Sato et al. 2009; Tsukuba Research Institute; 47:414-22). A obtenção, caracterização da pluripotência e a perpetuação de tais linhagens, é um importante modelo para possíveis estudos em espécies com interesse econômico, como a bovina. Embriões foram obtidos a partir de 5 fêmeas da linhagem C57BL/6J/EGFP, com idade entre 21 e 30 d, pesando cerca de 35g e superestimuladas segundo Mancini et al. (2008; Transgenic Research, 17:1015). As fêmeas cruzaram com machos férteis da mesma linhagem, idade entre 60 e 90 d e pesando cerca de 45g. Cada macho teve acesso a uma única fêmea e o tampão vaginal confirmou o cruzamento (0,5 dia pós-cópula, ou dpc). A colheita embrionária foi realizada entre 3,5 e 4,0 dpc, para obter blastocistos expandidos (BX) e/ou ecotóidos (BE). Nos BX, a zona pelúcida foi removida com Pronase e então ambos (BX/BE; n=8) foram depositados inteiros (massa e trofotoderma) em placas de 4 poços (NUNC, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) tratadas com gelatina de pele de suíno 0,1%, sob monocamada de fibroblastos primários murinos (FPM), em meio DMEM (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 7,5% de SFB (Cripion, Andradina, BR) e 7,5% de KSR (Gibco), 10mM βmercaptoetanol, 1mM piruvato sódico, 2mM L-glutamina e 83,4 µg/mL amicacina (Instituto Bioquímico, RJ, BR) por 24 h. Após esse período, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 15% de KSR. As colônias começaram a se formar entre 3 e 6 dias após a cultura dos embriões nas placas de 4 poços. Uma vez estabelecidas as colônias, o reorque para novas placas contendo FPM realizou-se a cada 48 a 72 h. Após 14 d, a derivação foi confirmada e a multiplicação, para obter um número excedente de colônias e a sua criopreservação, realizada. Subseqüentemente, parte das colônias foram criopreservadas e as demais utilizadas para a comprovação da pluripotência (imunofluorescência para Oct3/4, Sox2 e Nanog, além da cariotipagem). A reação foi positiva para todos os marcadores testados, além da detecção da fluorescência endógena da própria proteína EGFP oriunda da linhagem C57BL/6J utilizada. Concluiu-se que a derivação de CTE de linhagem refratária como a C57BL/6J/EGFP é exequível, embora com uma taxa de sucesso de 12,5%. Suporte financeiro: FAPESP.

RESUMO 198

ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS

De Vita, B.<sup>1</sup>; Maia, L.<sup>1</sup>; Freitas, N.P.P.<sup>1</sup>; Landim-Alvarenga, F.C.<sup>1</sup>; Laufer-Amorim, R.<sup>2</sup>; Prestes, N.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária; <sup>2</sup>Depto de Patologia Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, Unesp/Botucatu, SP - Brasil  
E-mail: bruddev@gmail.com

Na composição da membrana amniótica estão presentes células multipotentes, células-tronco mesenquimais, derivadas do feto em desenvolvimento capazes de atuar na hematopoiese e se diferenciar em tecidos mesenquimais como células das linhagens osteogênica, adipogênica, e condrogênica. O interesse neste tipo celular cresceu exponencialmente nos últimos anos como fonte alternativa às células-tronco embrionárias devido ao seu rápido crescimento, boa plasticidade, além de seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico. Os objetivos deste estudo foram o isolamento, cultivo e a caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica de fetos caninos. As amostras da membrana amniótica foram coletadas, durante cesarianas de gestações a termo, de fetos caninos sem raça definida. Os fragmentos de membrana amniótica foram lavados em PBS e colocados em solução de colagenase (Sigma) a 37°C por 40 minutos. A suspensão foi centrifugada, o "pellet" foi ressuspenso em meio de cultivo DMEM (Invitrogen) com 20% de Soro Fetal Bovino, suplementado com antibióticos e antimicótico e centrifugado novamente. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL do meio, colocados em frascos de 25cm<sup>2</sup> e cultivados em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37,5°C. O meio de cultivo foi trocado a cada 48h, seguido de troca duas vezes por semana. Após a tripsinização para a terceira passagem, as células foram ressuspenso em PBS, a solução foi citocentrifugada e as células foram dispostas em lâminas, fixadas para avaliação imunocitoquímica quanto à Vimentina (marcador para células mesenquimais indiferenciadas) e Citoqueratina (marcador para células de origem epitelial). Foram realizados controles negativos para os dois marcadores. As células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica de cães são de fácil obtenção e isolamento, aderiram ao fundo do frasco em 24 horas e em 48 horas já apresentavam morfologia fibroblástica que vêm se mantendo após a quarta passagem. As células de morfologia fibroblástica derivadas da membrana amniótica foram positivas para Vimentina e negativas para Citoqueratina. As análises da imunohistoquímica positiva para Vimentina e negativa para Citoqueratina demonstraram a caracterização de célula mesenquimal indiferenciada. No entanto, novos testes para demonstrar a presença de marcadores de multipotencialidade, estudos da ultraestrutura celular por microscopia eletrônica, provas de citogenética para avaliação da manutenção do cariótipo, a indução *in vitro* das diferenciações nos tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso, estão sendo realizados. Agradecimentos: Capes, Fapesp e Fundunesp.