SP 5247 P. 167
2011
SP-PP-5247

R225 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

ÊXITO NO ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E DIFERENCIAÇÃO NAS LINHAGENS OSTEOGÊNICA, ADIPOGÊNICA E CONDROGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) PROVENIENTES DO LÍQUIDO AMNIÓTICO EQUINO

BRUNA DE VITA[1]; IAN MARTIN[2]; LORETA LEME CAMPOS[3]; AMANDA JERONIMO LISTONI[4]; NATÁLIA PEREIRA PAIVA FREITAS[5]; LEANDRO MAIA[6]; ISADORA ARRUDA[7]; ILUSCA FINGER[8]; BRUNA DA ROSA CURCIO[9]; FERNANDA DA CRUZ LANDIM ALVARENGA[10]; RENEÉ LAUFER AMORIM[11]; NEREU CARLOS PRESTES[12]

[1,2,3,4,5,6,7,10,11,12]FMVZ - UNESP, BOTUCATU, SP, BRASIL; [8,9]UFPEL, PELOTAS, RS, BRASIL

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; líquido amniótico; equino

A medula óssea é a fonte mais utilizada de CTM na medicina equina, no entanto como a quantidade e a capacidade de diferenciação destas células diminuem com a idade, seu potencial terapêutico também diminui com o tempo. Portanto, nas últimas décadas houve um crescente interesse na busca de novas fontes de CTMs, destacando-se as células com origem nos anexos fetais, que já demonstraram manter características de pluripotencialidade dos tecidos dos quais se originam (Cremonesi, 2011, Theriogenology, 75, 1400-1415). O presente estudo teve como objetivo isolar, caracterizar imunofenotipicamente e diferenciar as CTMs do líquido amniótico (LA) eqüino nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. As amostras foram coletadas de úteros gravídicos em abatedouros e transportadas a 5°C até o laboratório no sistema de transporte Botutainer® (Botupharma, Botucatu/BR). As amostras foram centrifugadas e os "pellets" ressuspendidos em meio de cultivo composto por DMEM, F12, Soro fetal bovino, antibióticos e antimicótico (Gibco® - NY/USA). O cultivo se manteve em estufa a 37°C, com 5% de CO2. Após a segunda passagem parte das células foi fixada em paraformaldeído a 4%, em placas "24 wells": Foi realizada a imunocitoquímica utilizando os anticorpos anti - Vimentina, Citoqueratina, CD 44, PCNA, OCT 4. A outra parte das amostras foi mantida em cultivo e após a terceira passagem induziu-se a diferenciação nas linhagens citadas substituindo-se o meio de manutenção por meios compostos pelos respectivos kits de diferenciação (Gibco®-NY/USA). A diferenciação foi verificada através das colorações Alizarin Red (osteogênica), Oil Red O (adipogênica), Azul de Toluidina e Alcian Blue (condrogênica; Sigma®, St. Louis/USA). Os resultados foram positivos para Vimentina, CD44 e PCNA, e negativos para Citoqueratina confirmando a origem mesenquimal das células e sua capacidade de proliferação. A não marcação para OCT-4 diferiu dos resultados demonstrados na literatura, no entanto não foi realizada a avaliação quantitativa e como a população de células do LA é muito heterogênea a porcentagem de expressão do marcador pode variar com as amostras. A imunocitoquímica realizada diretamente na placa de cultivo foi eficaz para caracterizar a população de células estudadas, mantendo a morfologia fibroblastóide das mesmas. As colorações para Alizarin Red, Oil Red O, Azul de Toluidina e Alcian Blue demonstraram a presença de mineralizações de cálcio, lipídeo intracitoplasmático e glicosaminoglicanos confirmando o potencial de diferenciação das células obtidas do LA nas três linhagens celulares citadas. Sendo assim, concluímos que o isolamento, a caracterização e a diferenciação de CTMs provenientes do LA eqüino foram obtidos com êxito.

R226 - BIOTECNOLOGIAS SUPORTE: CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOBIOLOGIA, DIAGNÓSTICO POR IMAGENS, BIOLOGIA MOLECULAR E "ÔMICAS"

ALTERAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O METABOLISMO DE GLICOSE EM OÓCITOS BOVINOS MATURADOS IN VITRO OU IN VIVO

SABINE WOHLRES-VIANA[1]; MICHELE MUNK PEREIRA[2]; JOSÉ NELIO S. SALES[3]; AGOSTINHO JORGE DOS REIS CAMARGO[4]; CAROLINA CAPOBIANGO R. QUINTÃO[5]; NATANA CHAVES RABELO[6]; ANNA CAROLINA DENICOL[7]; LUIZ GUSTAVO BRUNO SIQUEIRA[8]; JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA[9]; LUIZ SÉRGIO ALMEIDA CAMARGO[10]; MARTA FONSECA M. GUIMARÃES[11]; LILIAN TAMY IGUMA[12]

[1,2,5]UFJF, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL; [3]USP, SÃO PAULO, SP, BRASIL; [4]PESAGRO, NITERÓI, RJ, BRASIL; [5,7,8,9,10,11,12]EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL; [6]CES/JF, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL

Palavras-chave: mrna; desenvolvimento; gameta

Um dos desafios da área de biotecnologias reprodutivas refere-se ao entendimento do adequado padrão/perfil metabólico envolvido no desenvolvimento embrionário normal. As ferramentas de biologia molecular permitem a avaliação de alterações metabólicas em ambiente de cultivo *in vitro*, o qual pode induzir respostas epigenéticas que culminam em modificações no padrão de expressão gênica. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes relacionados com o transporte e metabolismo da glicose (GLUT1 – Transporte de glicose; IGF1R – Receptor de Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1, IGF2R – Receptor de Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2) em oócitos de animais da raça Gir (*Bos indicus*) maturados *in vivo* (grupo M1) e *in vitro* (grupo M2). O protocolo utilizado para a recuperação de oócitos M1 foi: Dia 0 (D0) – 2 mg de benzoato de estradiol + implante auricular de norgestomet; D4-D7 – 4 administrações de 200 mg de FSH de 24/24 horas, em doses decrescentes; D6 (manhã) – 150 µg de cloprostenol; D7 (tarde) – retirada do implante auricular; D8 (12:00h) – 25 mg de LH; D9 (manhã) – aspiração folicular (OPU). Para o grupo M2 foi realizada a sincronização de onda folicular da seguinte forma: D0 – 2 mg de benzoato de estradiol + implante auricular + 150 µg de cloprostenol; D5 – retirada do implante auricular; D6 – OPU. Os oócitos maturados *in vitro* (MIV) foram cultivados em meio TCM-199 (Invitrogen, CA, EUA) contendo 10% de soro de vaca em cio e 2µg de FSH (Pluset, Callier, Espanha) por 24h, a 38,5°C, 5% de CO2 e umidade saturada. Tanto os oócitos maturados *in vivo* quanto os maturados *in vitro* foram desnudados e agrupados em 3 conjuntos de 10, congelados em N2 líquido e mantidos a -80°C para posterior extração. A extração foi realizada utilizando o kit comercial RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. A transcrição reversa e a pré-amplificação do cDNA foram realizadas utilizando o kit comercial TransPlex Complete Whole Transcriptome Amplification Kit (WTA2 – Sigma Aldrich) de acordo com as especificações do fabricante. O cDNA obtido foi submetido a PCR em Tempo-Real, utilizando o gene β-actina como controle endógeno e o kit comercial Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, de acordo com as recomendações do fabricante, para a subsequente análise da expressão pelo software REST®. Os genes GLUT1 (1,37±0,07) e IGF1R (2,01±0,14) apresentaram super expressão ($P<0,05$) no grupo *in vitro* em relação ao *in vivo*, enquanto que no gene IGF2R (1,29±0,11) não houve diferença ($P>0,05$). Conclui-se que o ambiente de MIV pode alterar o padrão de expressão dos genes GLUT1 e IGF1R.

Apoio financeiro: Embrapa – Projeto Rede Genômica Animal (01.06.9.01.01.00) e Projeto Rede de Inovação em Reprodução Animal (01.07.01.002), CNPq,CAPES e Fapemig.

SP 5247
P.167

Anais da XXV Reunião Anual
da Sociedade Brasileira
de Tecnologia de Embriões
Realização:
SBTE
SOCIEDADE BRASILEIRA DE
TECNOLOGIA DE EMBRIÕES
www.sbte.org.br
XXV reunião anual da
sociedade brasileira de
tecnologia de embriões
18 A 20 DE AGOSTO
CUMBUCO | CE
COMPACT
disc
DIGITAL DATA
Fabricado por Wave Media - www.wavemedia.com.br - (85) 3253.3742