

R221 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

RELATO TÉCNICO: GESTAÇÃO DO PRIMEIRO CLONE EQUINO NO BRASIL

BRUNO VALENTE SANCHES¹; ANDRÉ GOMIERO RIGO²; JOSÉ HENRIQUE FORTES PONTES³; RODRIGO MENDES UNTURA⁴; LUCAS LOPES MOINO⁵; ANDREA CRISTINA BASSO⁶; PERLA DAGHER CASSOLI FLEURY⁷; JANAINA FERREIRA NAGAO⁸; MARIO MARTINEZ-DIAS⁹; VILCEU BORDIGNON¹⁰

^{1,2,3,4,5,6,7,8,9}IN VITRO BRASIL S/A, MOJI-MIRIM, SP, BRASIL; ¹⁰MACGILL, MONTREAL, CANADÁ

Palavras-chave: clone equino; transferencia nuclear; embrião

Clonagem equina por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tem evoluído muito nos últimos 10 anos após o nascimento dos primeiros clones na França e, em seguida, nos Estados Unidos em 2003. No entanto, os cavalos clonados ainda não foram produzidos no Brasil. Neste estudo, descrevemos, pela primeira vez o desenvolvimento *in vitro* e o estabelecimento da primeira gestação de clones equinos no Brasil a partir de embriões TNCS. Embriões TNCS foram produzidos *in vitro* utilizando oócitos maturados e células de fibroblastos da pele. Oócitos equinos foram obtidos a partir de ovários de matadouro por aspiração folicular e curetagem da parede folicular interna. Oócitos coletados foram maturados por 26 horas em DMEM F12 suplementado com LH, FSH, estradiol, IGF, EGF, FCS, ITS e antibióticos, sob óleo mineral em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂ e do ar de 95% a 38,5 ° C. Após a maturação, os oócitos foram libertados de suas células cumulus por pipetagem em uma solução de meio hialuronidase BO (440 U/mL). Linhas celulares foram estabelecidas a partir de biópsias de pele de animais adultos usando método padrão de cultura de células. Uma vez que atingiram confluência da cultura, as células foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso. Antes do uso na TNCS, as células foram descongeladas e cultivadas por 4-5 dias até atingir confluência total. Oócitos maduros (estádio MII) foram enucleados por micromanipulação sob luz ultravioleta e depois um tamanho de célula média foi injetado no espaço perivitelino de oócitos enucleados. Fusão celular foi induzida por estimulação elétrica em uma solução (0,25 M) sorbitol. Os ovócitos foram reconstruídos por partenogênese e ativados com ionomycine DMAP e, em seguida, foram cultivados em meio C4 por 24 horas em 5% de CO₂, O₂ e N₂ 5% a 90%. Foram então transferidos para DMEM F12 suplementado com (5 mg / ml) e BSA (25 ug / ml) e gentamicina cultivadas por 7-8 dias. Um total de 484 oócitos foram cultivados *in vitro* e 243 (50,2%) extrudados o primeiro corpo polar e foram considerados maturados. Com esses ovócitos, foram reconstruídos 100 embriões e 17 desenvolveram em blastocistos no final do período de cultivo *in vitro*. Os blastocistos foram transferidos para 17 eguas receptoras. Diagnóstico de gestação foi realizada após 14 dias a partir SCNT (dia 0). Sete prenhez foram confirmados e quatro delas permaneciam prenhes entre 30 e 45 dias após TNCS. Isto confirma a aplicação bem sucedida de TNCS para a produção de embriões equino *in vitro*, que têm o potencial para desenvolver para além do estágio de blastocisto. Estudos estão atualmente sendo realizados utilizando oócitos coletados *in vivo* através de aspiração folicular, que são esperadas para melhorar o desenvolvimento dos embriões TNCS

R222 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

TOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO EM FIBROBLASTOS BOVINOS

MICHELE MUNK PEREIRA¹; CAROLINA CAPOBIANGO ROMANO QUINTÃO²; HUMBERTO DE MELLO BRANDÃO³; NADIA BARBOSA REZENDE RAPOSO⁴; NATANA CHAVES RABELO⁵; SAVANA GIACOMINI BRITO⁶; JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA⁷; LUIZ ORLANDO LADEIRA⁸; LUIZ SÉRGIO ALMEIDA CAMARGO⁹

^{1,4}UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL; ^{2,3,7,9}EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL; ⁵CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DE JUIZ DE FORA, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL; ⁶UNIVERSIDADE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL; ⁸UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL

Palavras-chave: citometria de fluxo; viabilidade celular; transfecção gênica

Nanotubos de carbono (NTC) são nanomateriais promissores para carrear DNA exógeno e transfectar células visando aplicação na produção de animais transgênicos. Contudo, pouco se sabe sobre a toxicidade de NTC em fibroblastos bovinos. O objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade de NTC em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

Fibroblastos bovinos foram cultivados em meio DMEM (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e incubados a 37,0°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Após atingirem 60% de confluência, as células foram expostas aos NTC (nanotubos de carbono multicamadas - MWNT; diâmetro: 10-20nm; comprimento: 1-4 µm) por 24 h em diferentes concentrações: 0 µg/mL (Controle); 5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL. Posteriormente, as células foram submetidas a coloração com iodeto de propídio (50 µg/mL; Sigma, Saint Louis, EUA) e submetidas ao citômetro de fluxo (FACScalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA) equipado com laser (488nm) para avaliação da viabilidade celular pelo filtro (585±42nm). Foram realizadas três repetições em triplicata, resultando em nove cultivos, com a leitura de 10.000 eventos por cultivo. Os resultados foram analisados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. Foi verificado que na concentração de 5 µg/mL a viabilidade não foi alterada (92,13 ±0,88%), quando comparada ao controle (93,80±1,12%). Contudo, a viabilidade celular foi reduzida (P<0,001) nas concentrações de 25 µg/mL (88,21±0,96%), 50 µg/mL (84,78±0,82%) e 100 µg/mL (65,88±1,77%). A partir dos resultados obtidos, conclui-se que MWNT podem ser utilizados em cultivos de fibroblastos bovinos na concentração de 5 µg/mL sem alterar a viabilidade celular.

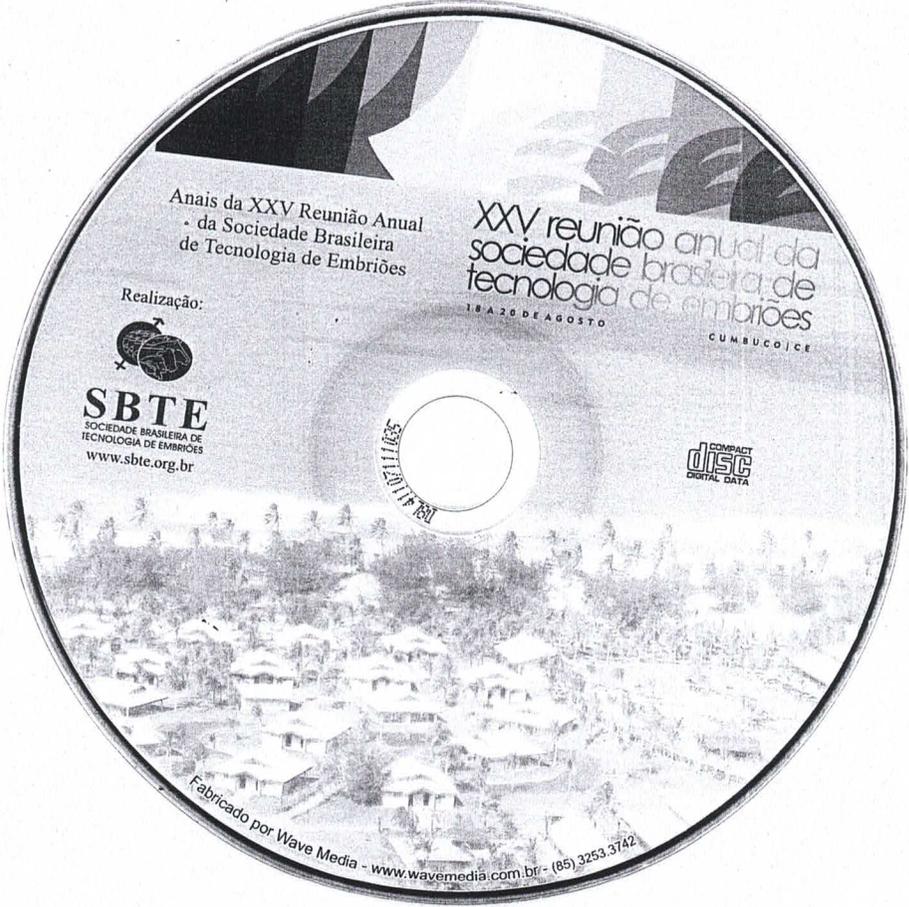
Agradecimentos: CNPq, CAPES, Fapemig e Projeto Rede de Inovação em Reprodução Animal (01.07.01.002).

SP 5248
P-167

2A

SP 5248 P. 167
2011
SP-PP-5248

Portv



Anais da XXV Reunião Anual
da Sociedade Brasileira
de Tecnologia de Embriões

XXV reunião anual da
sociedade brasileira de
tecnologia de embriões
18 A 20 DE AGOSTO
CUMBUÇUICE

Realização:



SBTE
SOCIEDADE BRASILEIRA DE
TECNOLOGIA DE EMBRIÕES
www.sbte.org.br



Fabricado por Wave Media - www.wavemedia.com.br - (85) 3253.3742