

R211 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

EFEITO DA TRICOSTATINA A NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM CÉLULAS SOMÁTICAS E SUBSEQUENTE GESTAÇÕES

LUIZ SÉRGIO ALMEIDA CAMARGO¹; CAROLINA CAPOBIANGO R. QUINTÃO²; ANNA CAROLINA DENICOL³; LILIAN TAMY IGUMA⁴; BRUNO CAMPOS CARVALHO⁵; LUIZ GUSTAVO BRUNO SIQUEIRA⁶; JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA⁷^{1,2,3,4,5,6,7}EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL**Palavras-chave:** clonagem; inibidores de histonas deacetilases; apoptose

A deacetilação de histonas do DNA está associada a uma cromatina compacta e menos permissiva, o que pode prejudicar a reprogramação do núcleo somático. A inibição da desacetilação pode ser alcançada com inibidores de histonas desacetilases, como a Tricostatina. Esse estudo avaliou o efeito do tratamento de zigotos com tricostatina na produção de embriões bovinos clones. Oócitos foram maturados *in vitro*, desnudados e expostos ao Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, EUA) e citocalasina (Sigma) antes da enucleação. Zigotos foram reconstruídos com células somáticas de fêmea adulta da raça Gir, fusionados com dois pulsos de 2,4 kV/cm de 30 µseg e ativados com ionomicina (Sigma) por 5 minutos. Em seguida, os zigotos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: Tricostatina (TRICO; n=132) – zigotos cultivados por 4h em 6-DMAP seguido de 7h em meio CR2aa com 2,5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil), ambos suplementados com 50nM de Tricostatina A (Sigma); Controle (CONT; n=116) – zigotos cultivados nas mesmas condições acima porém na ausência de Tricostatina A. Embriões partenogenéticos (PART; n=287) foram utilizados como controle. Os embriões de todos os grupos foram cultivados em CR2aa com 2,5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil) a 38,5°C, em atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ e umidade. Embriões com 168h pós-ativação (hpa) de ambos os grupos foram transferidos para receptoras. Analisou-se a taxa de clivagem com 72h, blastocistos com 168hpa, número total de células e índice de células apoptóticas em blastocistos por ANOVA, e médias comparadas pelo teste de SNK. Os valores são mostrados como média±EPM. As taxas de prenhes e de nascimento foram analisadas pelo Teste Exato de Fischer. Não houve diferença (P>0,05) entre os grupos TRICO, CONT e PART na taxa de clivagem (87,7±4,1%, 83,3±4,0% e 79,3±4,1%, respectivamente) e de blastocistos (38,4±4,7%, 34,2±6,0% e 30,5±3,7%, respectivamente). Embriões do grupo TRICO apresentaram menor índice (P<0,05) de células apoptóticas (0,065±0,009; n=17) do que os embriões do grupo CONT (0,129±0,021, n=13), mas semelhante ao grupo PART (0,083±0,011, n=19). Não houve diferença no número total de células. Embora não houvesse diferença significativa, o grupo TRICO resultou em taxa de gestação até os 60 dias numericamente maior (64,2%; 9/14) quando comparado com o grupo CONT (45,4%; 5/11). Uma gestação do grupo TRICO chegou a termo (7,1%; 1/14), porém com morte no segundo dia após o nascimento. Nenhum nascimento foi obtido com embriões do grupo CONT. Estes resultados sugerem que o tratamento de zigotos clones com 50 nM de tricostatina reduz a apoptose nos embriões, o que pode favorecer a taxa de prenhes. Apoio: Embrapa Projeto 01.07.01.002, CNPq e Fapemig.

R212 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

EFICIÊNCIA DA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR NA ESPÉCIE EQUINA: INJEÇÃO DIRETA DA CÉLULA DOADORA DE NÚCLEO EM CITOPLASTOS RECEPTORES

CLAUDIA BARBOSA FERNANDES¹; CAMILA GABRIELA PEREIRA GONÇALVES²; LILIAN RIGATTO MARTINS³; FERNANDA DA CRUZ LANDIM ALVARENGA⁴^{1,2}USP FMVZ, SAO PAULO, SP, BRASIL; ³UFMT, MATO GROSSO, MT, BRASIL; ⁴UNESP FMVZ, BOTUCATU, SP, BRASIL**Palavras-chave:** clonagem; ativação artificial; maturação nuclear

O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência do processo de TN com a injeção direta da célula doadora de núcleo em citoplastos receptores equinos. Foram utilizados na TN 150 ovócitos equinos compactos e expandidos, maturados *in vitro* (MIV) por 30h ou mantidos por 24h sob ação do roscovitine antes do período de MIV. Após as 30 h de MIV os ovócitos equinos foram desnudados e incubados por 30 min em meio MEM hepes acrescido de SFB, Hoescht 33342 e citocalasina B. A enucleação dos ovócitos e a reconstituição dos citoplastos receptores com fibroblastos equinos foram realizadas entre 32 e 34 h após o início da MIV. Os ovócitos em metáfase I (MI) e metáfase II (MII) enucleados e reconstituídos com êxito foram incubados por uma hora até o momento da ativação artificial utilizando os meios com Ionomicina + Roscovitine (I+R) e Ionomicina + 6 DMAP (I+6DMAP). Após o período de ativação os ovócitos foram cultivados em meio DMEM/F12, acrescido de SFB, mioinositol e gentamicina à 39°C em atmosfera com 5% de CO₂, 5% de O₂, e 90% de N₂ por 3 dias. A avaliação das taxas de ativação/formação de núcleo em descondensação foram realizadas com Hoescht 33342 em microscopia invertida. Foi utilizada a técnica de Análise de Deviance para selecionar o melhor modelo de regressão logística que explicasse o percentual de ovócitos equinos com formação do núcleo descondensado após a TN. Ovócitos equinos classificados como compactos expostos ou não ao roscovitine, em MI e MII no momento da enucleação apresentaram 0%, 20% e 37,5%, 25% na taxa descondensação nuclear após a ativação com I+R e 0%, 30% e 22,2%, 50% para I+6DMAP, respectivamente. Ovócitos equinos classificados como expandidos expostos ou não ao roscovitine em MI e MII, no momento da enucleação apresentaram 14,2%, 30% e 0%, 14,2% na taxa descondensação nuclear após a ativação com I+R e 12,5%, 20% e 20%, 33,3% para I+6DMAP, respectivamente. Pode-se observar que o único efeito significativo sobre as taxas de descondensação da cromatina foi o do estágio de maturação nuclear, independentemente da classificação do ovócito, do protocolo de ativação artificial e da exposição ou não ao roscovitine, o percentual de ovócitos com formação de núcleo descondensado no 3º dia de cultivo foi significativamente maior para a MII (p = 0,033) em relação à MI. Não houve efeito significativo de interação de nenhuma ordem entre os outros fatores analisados, no entanto, para a espécie equina a técnica de injeção direta da célula doadora de núcleo no citoplasto receptor resultou em índices insatisfatórios de produção de embriões clonados.

Agradecimento: FAPESP

