

33824
51725

SBTE 234 Clonagem, Transgênese e Células-Tronco

Prenhezes e nascimentos de bovinos clonados a partir de células do fluido amniótico e do tecido adiposo coletadas in vivoC.G. da Silva¹; E.R. da Cunha¹; C.F. Martins²; I. Pivato¹; H.C. Bessler²; G.H. Lima Martins¹; S.N. Bão¹¹Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil; ²EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, Brasil.**Palavras-chave:** Bovino; embriões; transferência nuclear

Células do fluido amniótico (CFA) e do tecido adiposo (CTA) foram caracterizadas como células tronco mesenquimais em algumas espécies de animais domésticos (Mauro *et al.*, 2010, *Vet Res Commun* 34, 25-8; De Mattos Carvalho *et al.*, 2009, *Vet Immunol Immunopathol*, 132, 303-06), e apesar do seu potencial para utilização como doadoras de núcleo, ainda não haviam sido utilizados na transferência nuclear (TN) em bovinos. O objetivo desse trabalho foi testar a eficiência de utilização de CFA e CTA na TN em bovinos. A coleta das CFA foi realizada por meio de aspiração intra-vaginal guiada por ultrassom, sem causar prejuízo para o feto de 64 dias. O fluido amniótico foi centrifugado e o sedimento cultivado em Amniomax Complete II (Gibco, Rockville, USA). Já as CTA foram coletadas por biópsia na região perineal da mesma bezerra com sete meses de idade e cultivadas por meio de explante em meio DMEM (Invitrogen Life Science, USA). A caracterização morfológica foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura. As células isoladas foram utilizadas em procedimento de TN segundo Kuroiwa *et al.* 2002 (*Nature*, 20, 889-94), com modificações. A verificação estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) (SAS 9.1.2). A taxa de blastocistos foi de $45,46 \pm 13,03\%$ e $46,47 \pm 7,92\%$ para CFA e CTA, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os grupos. A taxa de prenhez aos 35 dias foi de $12,5\%$ (1/8) para CFA e 25% (1/4) para CTA. Hidropsia foi observada na gestação de CFA aos 245 dias, cujo parto foi induzido aos 277 dias, e após 36 horas foi realizada cesariana para retirada da bezerra com vida. O animal pesou 58,5 kg e ao exame externo foram observados dentes não formados completamente, espessamento do cordão umbilical e flexão bilateral das articulações metatarsofalangeanas. O animal faleceu por complicações respiratórias. Na necropsia constatou-se hidrotórax seroso, líquido de aspecto aerado por toda traqueia, líquido no parênquima pulmonar, fígado de tamanho aumentado, com coloração amarelada e deposição de gordura superficial. A bezerra clonada a partir das CTA nasceu aos 291 dias por meio de parto normal assistido, pesando 35 kg. Nenhuma alteração clínica foi observada na bezerra, que se encontra saudável. As taxas de prenhez obtidas superam as relatadas na literatura, entretanto, o animal gerado a partir de CFA apresentou a síndrome do bezerro gigante, frequentemente associada aos animais clonados, enquanto esta alteração não foi observada no animal proveniente de CTA, sugerindo que este novo tipo celular possa ser utilizado na TN, porém novos estudos devem ser realizados.

SBTE 235 Clonagem, Transgênese e Células-Tronco

Geração de células induzidas à pluripotência bovina (biPS) e produção de embriões clonados derivados das células biPS por transferência nuclearF.F. Bressan¹; J.R. Sangalli²; R.V. Sampaio²; F. Percin¹; F.V. Meirelles¹¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (FZEA/USP), Pirassununga, SP, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), São Paulo, SP, Brasil.**Palavras-chave:** Transferência nuclear; células-tronco; pluripotência induzida (iPS)

O emprego da transferência nuclear (TN) em bovinos dentre as biotecnologias reprodutivas para aumento da produção animal é limitado pela sua baixa eficiência, que decorre da incompleta reprogramação do núcleo doador. Estratégias que resultem em melhor reprogramação de núcleo após a TN, como por exemplo, a utilização de células doadoras mais indiferenciadas já se mostraram capazes de aumentar a produção de embriões clonados. Uma vez que a manutenção *in vitro* de células bovinas pluripotentes de origem embrionária é uma metodologia pouco dominada, o objetivo deste estudo foi gerar células bovinas pluripotentes induzidas (biPS) e utilizá-las como doadoras de núcleo na transferência nuclear visando o aumento da eficiência da reprogramação nuclear. Para tal, células biPS foram produzidas mediante transdução lentiviral de fatores de transcrição murinos relacionados à pluripotência (Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4 - OSKM) em fibroblastos bovinos. As células biPS foram caracterizadas quanto à morfologia, expressão gênica, imunofluorescência de fatores relacionados à pluripotência, detecção da fosfatase alcalina, formação de corpos embrioides e diferenciação *in vitro*, formação de teratomas *in vivo* e aquelas efetivamente caracterizadas com biPS foram utilizadas como doadoras de núcleo na clonagem. Resumidamente, oócitos bovinos obtidos de ovários provenientes de abatedouros foram maturados *in vitro* por 18h, enucleados e reconstruídos com células biPS (n=203) ou fibroblastos fetais bovinos (bFF, n=153), em cinco repetições. Após reconstrução os embriões foram ativados com ionomicina e 6-DMAP e cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto. Foram avaliadas as taxas de fusão, clivagem (48h após ativação) e desenvolvimento a blastocisto (192h após ativação) e os resultados foram submetidos ao teste de Qui-quadrado a 5% de significância. Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto à taxa de clivagem (81,53 vs 88,96%) e produção a blastocisto (22,68 vs 29,63%, respectivamente); porém o grupo reconstruído com células iPS apresentou uma menor taxa de fusão (47,78 vs 70,59%). Em conclusão, células biPS bovinas foram produzidas e geraram embriões clones quando utilizadas na TN. O entendimento dos mecanismos de reprogramação nuclear e produção de organismos derivados de células reprogramadas deverá contribuir para o aumento da eficiência de biotécnicas da reprodução.

Suporte financeiro: FAPESP e CNPq