

R223 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

TRANSFERÊNCIA NUCLEAR COM FIBROBLASTOS BOVINOS EM APOPTOSES: A MORTE CELULAR PROGRAMADA PODE SER REPROGRAMADA?**MOYSÉS DOS SANTOS MIRANDA¹; FABIANA FERNANDES BRESSAN²; TIAGO HENRIQUE CÂMARA DE BEM³; GIOVANA KREMPER MERIGHE⁴; WILLIAM ALLAN KING⁵; OTÁVIO MITO OHASHI⁶; FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES⁷**^{1,6}UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, BELEM, PA, BRASIL; ^{2,3,4,7}FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS, PIRASSUNUNGA, SP, BRASIL; ⁵UNIVERSITY OF GUELPH, GUELPH, CANADÁ**Palavras-chave:** transferência nuclear; apoptose; reversibilidade

Apoptose é uma morte celular programada considerada irreversível. Porém, sua reversibilidade parece ser possível caso as células não tenham atingido o "ponto de não retorno" (Span *et al.* 2002, Cytometry 47, 24-31). Entretanto, a caracterização deste limite ainda não é bem documentada. O objetivo deste trabalho foi acrescentar informações sobre este assunto ao utilizar células apoptóticas na técnica de transferência nuclear (TN). Fibroblastos de bovinos adultos foram cultivados em DMEM, tratados com 10µM de estaurosporina (STS) por 3h e analisados quanto a externalização da fosfatidilserina (ensaio Anexina V), presença de caspase9 ativa (FLICA Apoptosis Kit, Bloomington, USA), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$; corante JC-1) e fragmentação nuclear (ensaio TUNEL). Ovócitos bovinos obtidos em matadouro foram submetidos a MIV em TCM199 com 0,5 µg/ml de FSH e 50 µg/ml de LH. A TN foi realizada segundo Miranda *et al.* (2009 Cloning and Stem Cells 11, 565-575). Células Anexina-positivas (Anx+) e Caspase9-positivas (Casp9+) foram separadas por citometria de fluxo e imediatamente utilizadas para clonagem. Fibroblastos não tratados, separados pelo citômetro de fluxo, serviram como Controle. Embriões reconstruídos foram cultivados em estufa com 5% de CO₂ a 38,5 °C em meio SOF. Taxas de fusão, clivagem e blastocistos foram analisadas pelo Qui-quadrado ($p < 0,05$). Dados da marcação com Anexina V, Caspase9 e JC-1 foram calculados pelo citômetro e analisados pelo teste "t" de Student ($p < 0,05$). Os resultados de TUNEL foram analisados qualitativamente por microscopia de fluorescência. Após o tratamento com STS por 3h, 89,9% das células estavam Anx+ (4,6% nas células Controle; $p < 0,01$), 24,9% estavam Casp9+ (2,4% nas células Controle; $p < 0,01$), houve redução de 70% do $\Delta\Psi_m$ ($p < 0,05$) e o sinal do ensaio de TUNEL não foi detectado em nenhum núcleo. A fusão e a clivagem não foram influenciadas pelo uso das células apoptóticas ($p > 0,05$). O uso de células Anx+ também não afetou a produção de blastocistos em comparação ao controle (26,4 vs. 22,9%, respectivamente; $p > 0,05$). No entanto, o uso de fibroblastos Casp9+ reduziu significativamente a formação de blastocistos clonados (12,3%; $p < 0,05$). Estes resultados contribuem com nova evidência sobre a reversibilidade da apoptose uma vez que células com sintomas típicos do início do processo de morte (perda do $\Delta\Psi_m$ e exposição de fosfatidilserina) foram eficientemente reprogramadas para formar embriões. Além disso, já que poucos fibroblastos Casp9+, TUNEL negativos, foram reprogramados, nós propomos que o "ponto de não retorno" apoptótico pode estar localizado em torno da ativação Caspase9, antes da fragmentação nuclear. Mais experimentos são necessários para confirmar esta hipótese

R224 - CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

USO DA COLHEITA TRANSCERVICAL DE EMBRIÕES EM CABRA TRANSGÊNICA PARA O FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS HUMANO (HG-CSF)**RAYLENE RAMOS MOURA¹; JOANNA MARIA GONÇALVES DE SOUZA²; TALLES MONTE DE ALMEIDA³; MAIARA PINHEIRO VIEIRA⁴; CARLOS HENRIQUE SOUSA DE MELO⁵; RIBRIO IVAN TAVARES PEREIRA BATISTA⁶; ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA⁷; DÁRCIO ÍTALO ALVES TEIXEIRA⁸; LUCIANA MAGALHÃES MELO⁹; JEFERSON FERREIRA FONSECA¹⁰; VICENTE JOSÉ DE FIGUEIRÊDO FREITAS¹¹**^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,11}UECE, FORTALEZA, CE, BRASIL; ¹⁰EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, SOBRAL, CE, BRASIL**Palavras-chave:** transgênese; caprino; hg-csf

Caprinos são utilizados como modelo de animais transgênicos secretando proteínas recombinantes no leite. Após obtenção dos fundadores é imprescindível a multiplicação para formação do rebanho transgênico, que pode ser realizada pela transferência de embriões produzidos *in vivo*. Contudo, a colheita de embriões em caprinos é comumente realizada por via cirúrgica, podendo causar aderências que inviabilizam colheitas continuadas no mesmo animal. O objetivo do estudo foi utilizar a colheita de embriões por via transcervical em cabra fundadora obtida por nosso grupo (Freitas *et al.*, 2010, Transgenic Res., 19, 146) para transferência em receptoras sincronizadas. Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética e biossegurança da UECE. Uma cabra transgênica como doadora da raça Canindé, dois bodes não transgênicos da mesma raça e quatro receptoras sem padrão racial definido foram utilizadas. A doadora foi submetida a um tratamento de sincronização do estro e superovulação utilizando progestágeno (Progespon®, Buenos Aires, Argentina), injeções de pFSH (Folltropin®, Ontario, Canada) e cloprostenol (Prolise®, Buenos Aires, Argentina). Na prevenção da regressão de corpo lúteo (CL) foi utilizado flunixin-meglumine (Flumedin®, Varginha, Brasil). A fecundação da doadora ocorreu no início do estro e 24 h após. O número de CL foi verificado por laparoscopia antes da colheita, a qual foi realizada sete dias pós-estro. Doze horas antes da colheita a doadora recebeu 37,5 µg de cloprostenol para dilatação cervical. Para colheita transcervical utilizou-se um circuito e sonda para pequenos ruminantes (Circuito/sonda para coleta de embriões de caprinos e ovinos®, Embrapa, Brasília, Brasil). Foi possível a recuperação de quase a totalidade do meio de lavagem ao fim do processo. A doadora apresentou 11 CLs e foram recuperadas oito estruturas, obtendo-se uma taxa de colheita de 72,7%. Cinco blastocistos grau I, um grau II e uma mórula compacta foram transferidos. Os embriões colhidos foram transferidos por semi-laparoscopia para receptoras que receberam progestágeno e cloprostenol associados a uma injeção de eCG (Novormon®, Buenos Aires, Argentina). O diagnóstico de gestação realizado por ultrassonografia aos 30 e 45 dias pós-estro. As crias transgênicas foram identificadas por PCR. Aos 30 dias, a taxa de gestação nas receptoras foi de 75,0% (3/4) e caiu para 50,0% (2/4) aos 45 dias. Das duas receptoras prenhes, uma apresentou gestação gemelar, totalizando três crias. Uma fêmea transgênica foi identificada por PCR. Neste estudo, 33,3% das crias nascidas eram transgênicas. Em conclusão, a colheita transcervical de embriões mostrou-se ser um método eficiente para multiplicação da fêmea transgênica fundadora para o hG-CSF.