

SALÃO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XXIX SIC
**UFRGS**
PROPESQ



múltipla 
UNIVERSIDADE
inovadora  inspiradora

Evento	Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2017
Local	Campus do Vale
Título	Efeitos da exposição a citocalasina B e do meio tampão na sobrevivência, desenvolvimento embrionário e expressão de gene repórter após microinjeção citoplasmática com DNA
Autor	VALQUIRIA FEIJÓ MARTINS
Orientador	MARCELO BERTOLINI

Efeitos da exposição a citocalasina B e do meio tampão na sobrevivência, desenvolvimento embrionário e expressão de gene repórter após microinjeção citoplasmática com DNA

Valquíria Feijó Martins; Marcelo Bertolini – UFRGS

Com o advento das nucleases de edição do DNA, a microinjeção (MI) de embriões reemergiu como procedimento importante para a obtenção de modificações genéticas para diversas aplicações e interesses. No entanto, a eficiência do procedimento de MI *per se* é um dos determinantes no sucesso na obtenção de animais com modificações genéticas precisas. O objetivo deste experimento foi comparar os efeitos do meio tampão para a diluição do DNA e do uso de desestabilizadores de filamentos de actina para a MI citoplasmática de embriões bovinos no estágio de 1-célula sobre a taxa de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de embriões, e expressão de gene repórter no estágio de blastocisto. Para uso na MI, um plasmídeo circular projetado para expressão de GFP (pEGFP-N1, Clontech Laboratories, CA, USA) foi diluído na concentração de 30 ng/ μ L em meio tampão Tris-EDTA (TE), composto de 10 mM TRIS e 1 mM EDTA ou solução fisiológica intracelular (SF), composta de 135 mM KCl e 10 mM Hepes, com osmolaridade de 270 mOsm/kg, com ou sem previa exposição dos embriões a um meio de manipulação contendo 5 μ g/mL de citocalasina B (CCB). Após a obtenção de complexos *cumulus*-oócitos bovinos a partir de ovários de abatedouro, e seguindo-se a MIV por 17 h, embriões bovinos foram produzidos partenogeneticamente por ativação química pela exposição a 5 μ M ionomicina por 5 min, seguido de incubação em 2 mM 6-DMAP por 4 h. Passadas 6 h da ativação, os embriões foram distribuídos em quatro grupos experimentais: grupo TE, grupo TE+CCB, grupo SF e grupo SF+CCB, com um grupo controle não microinjetado. Os embriões dos grupos TE+CCB e SF+CCB foram incubados por 5 min antes da microinjeção. A microinjeção foi realizada com um microinjetor Femtojet 4i (Eppendorf, Germany) acoplado a um micromanipulador. O volume injetado durante a MI era de aproximadamente 15 pL (1,5% do volume total do embrião). Após a injeção, as estruturas lisadas ou mortas foram descartadas, com as demais, incluindo o grupo controle, sendo lavadas em meio de manipulação e cultivadas *in vitro* por sete dias. As taxas de sobrevivência, clivagem, blastocisto e expressão do GFP foram comparadas entre grupos utilizando o teste do Chi quadrado ($P < 0,05$). Após cinco repetições, 1.432 ovócitos maturados foram quimicamente ativados e 1.053 microinjetados. Em geral, os embriões tratados com CCB apresentaram maiores taxas de sobrevivência pós-MI (82,3%, 427/519) e de blastocistos (28,3%, 121/427) do que os não tratados (67,6%, 361/534 e 21,9%, 79/361, respectivamente), independentemente do meio tampão, sem efeito sobre as taxas de clivagem (61,8%, 264/427 vs. 63,2%, 228/361, respectivamente), com taxas de clivagem e blastocistos sendo semelhantes ao controle (70,6%, 190/269 e 26,4%, 71/269, respectivamente). O uso de tampões de TE ou SF, independentemente do tratamento CCB, não afetou a sobrevivência (73,1%, 384/525 vs. 76,5%, 404/528) ou as taxas de blastocistos entre os grupos (28,1%, 108/384 vs. 22,8% 92/404) e controles (26,4%, 71/269), mas a taxa de clivagem foi menor usando tampão SF do que o grupo controle (61,1%, 247/404 vs. 70,6%, 190/269, respectivamente), sendo ambos semelhantes aos Grupo TE (63,8%, 245/384). Os grupos TE e CCB + SF apresentaram taxas de clivagem semelhantes (61,3%, 106/173 e 57,9%, 125/216), porém inferiores aos controles (70,6%, 190/269), enquanto a SF (64,9%, 122 / 188) e os grupos CCB + TE (65,9%, 139/211) foram semelhantes a todos os grupos. O grupo CCB + TE apresentou melhor desenvolvimento a blastocisto (30,3%, 64/211) do que SF (18,6%, 35/188), sendo ambos similares ao controle (26,4%, 71/269), TE (25,4%, 44 / 173) e grupos CCB + SF (26,4%, 57/216). A incubação em CCB não afetou a expressividade de GFP (50,4%, 61/121) em blastocistos quando comparada a não exposição de CCB (51,9%, 41/79). No entanto, a diluição do DNA no tampão TE melhorou o número de blastocistos GFP+ (62,0%, 67/108) do que o tampão SF (38,0%, 35/92). Uma maior proporção de embriões GFP+ foi observada no grupo CCB + TE (63,5%, 40/64) do que os grupos SF (40,0%, 14/35) e CCB + SF (36,8%, 21/57), com o Grupo TE semelhante (61,4%, 27/44) aos grupos CCB + TE e SF. Concluímos que a microinjeção de ácidos nucleicos em embriões bovinos no estágio de 1-célula foi mais eficaz quando o DNA foi diluído em meio tampão contendo TRIS-EDTA e com a pré-exposição à CCB. Tal combinação promoveu menor lise e maiores taxas de clivagem, de blastocistos e produção de embriões GFP+ no estágio de blastocisto.