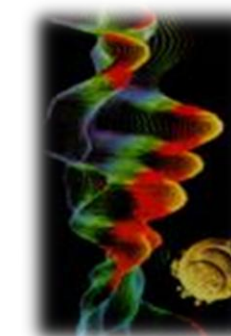


Efeitos da exposição à citocalasina B e do meio tampão na sobrevivência, desenvolvimento embrionário e expressão de gene repórter após microinjeção citoplasmática com DNA



Valquiria Feijó Martins¹, Marcelo Bertolini²

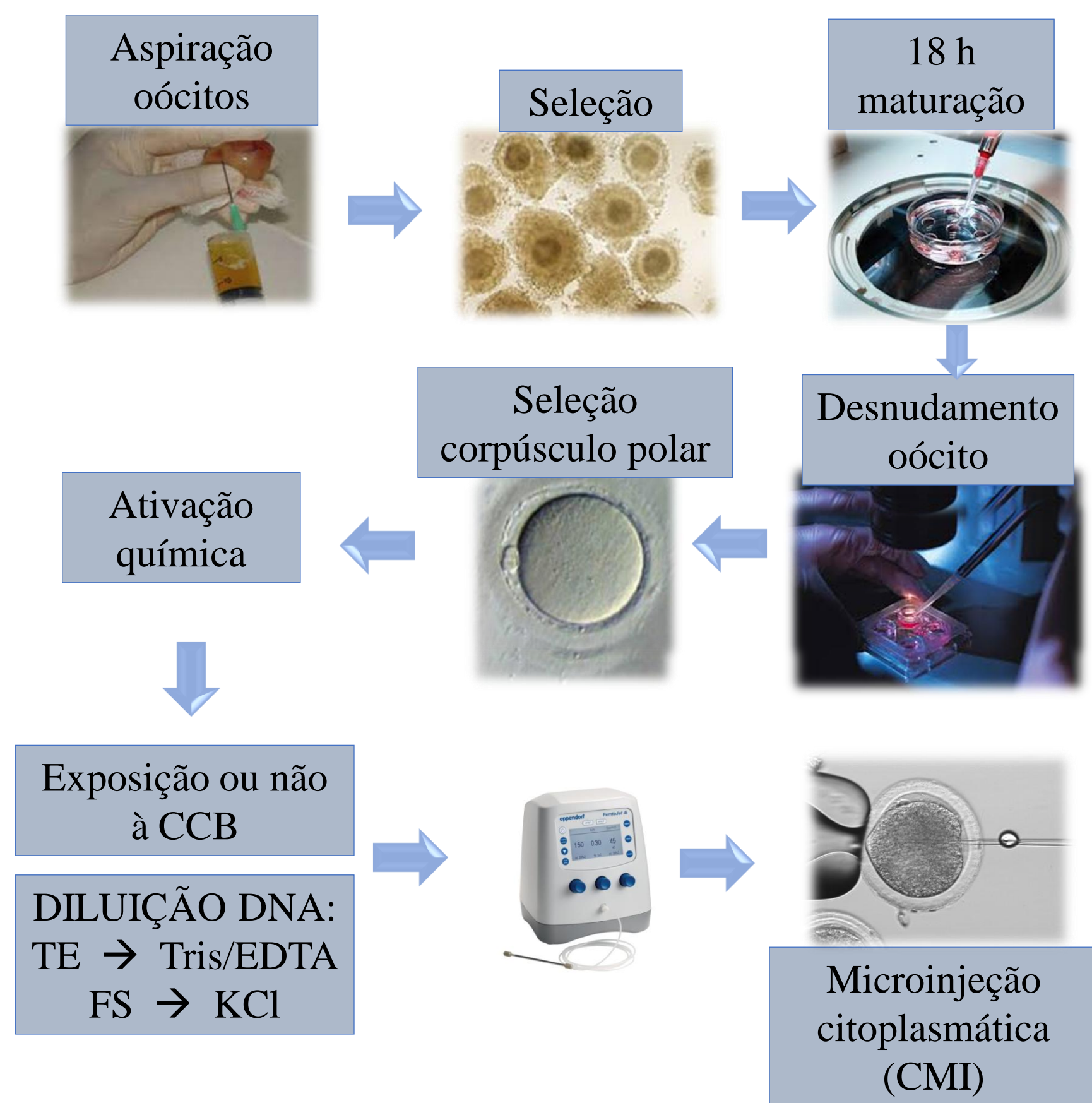
¹ Acadêmica do curso de Medicina Veterinária UFRGS, ² Docente UFRGS
Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução FAVET/UFRGS

INTRODUÇÃO

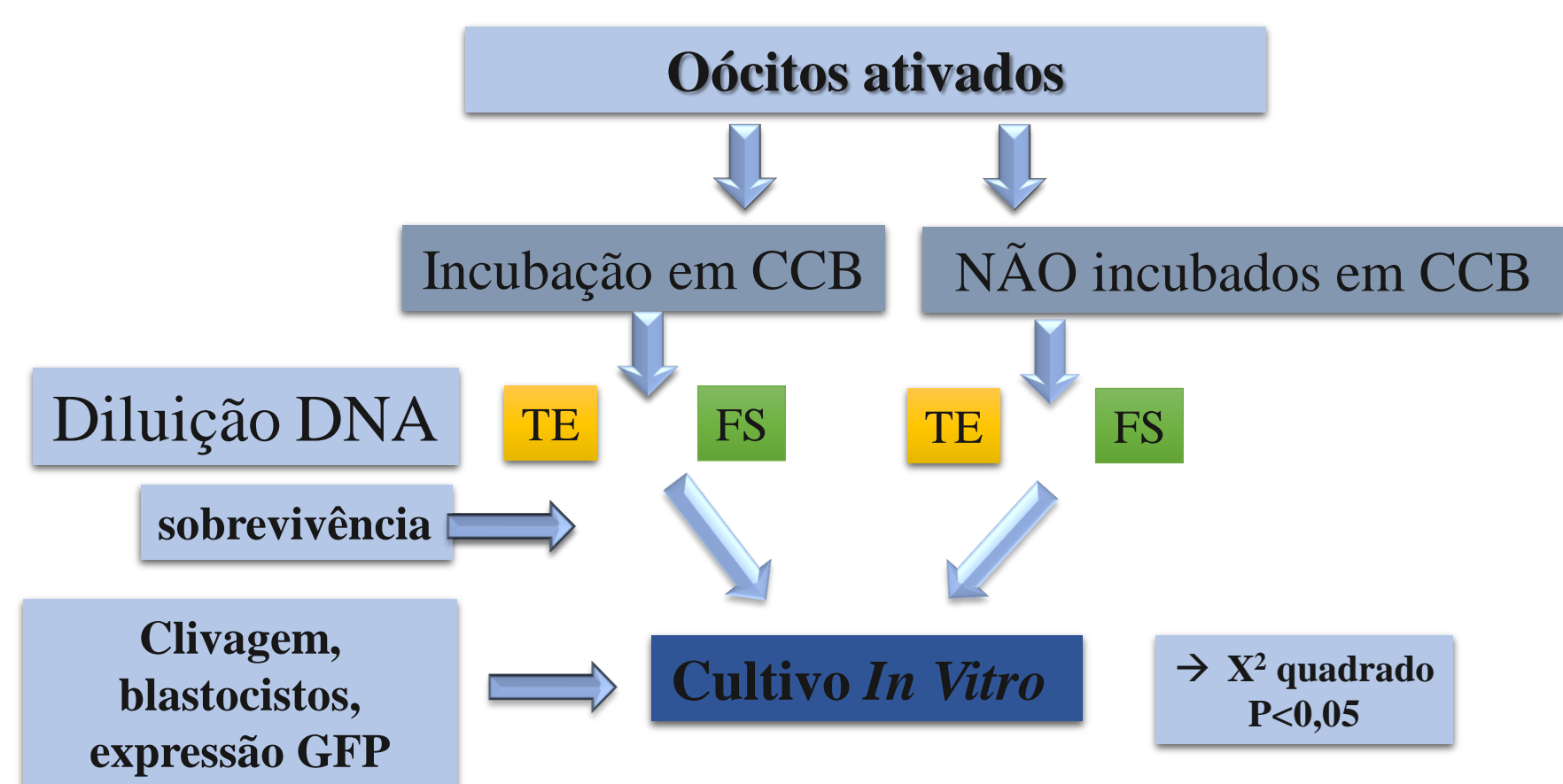
Com o advento das nucleases de edição de DNA, a microinjeção (MI) dos embriões ressurgiu como um procedimento importante para a obtenção de modificações genéticas para várias aplicações e interesses. No entanto, a eficiência do procedimento de MI *per se* é um dos determinantes do sucesso na obtenção de animais com modificações genéticas precisas.

O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência *in vitro* de meios tampão distintos para fornecer ácidos nucleicos em embriões bovinos por microinjeção citoplasmática (MI). Os tampões baseados em Tris-EDTA (TE) e baseados em KCl (SF) foram comparados para a diluição do DNA (vetor GFP circular) a 30 ng/μL para a MI de embriões bovinos após 5 min de incubação ou não em 5 μg/mL de citocalasina B (CCB) no meio antes da MI.

MATERIAIS E MÉTODOS



GRUPOS EXPERIMENTAIS



RESULTADOS

Tabela 1. Taxas de sobrevivência, clivagem e blastocistos *in vitro* e resultado de expressão de GFP após microinjeção de vetor GFP circular em embriões partenogênicos de uma célula diluídos em tampões TE ou FS pré incubados ou não em citocalasina B.

Grupo	Embriões n	Taxa Sobrevivência		Taxa Clivagem		Taxa Blastocisto		Embriões GFP+	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Controle	269	-	-	190	70.6 ^a	71	26.4 ^a	-	-
TE	264	173	65.5 ^b	106	61.3 ^b	44	25.4 ^{ab}	27	61.4 ^{ab}
TE+CCB	261	211	80.8 ^a	139	65.9 ^{ab}	60	30.3 ^a	40	63.5 ^a
SF	270	188	69.6 ^b	122	64.9 ^{ab}	35	18.6 ^b	14	40.0 ^b
SF+CCB	258	216	83.7 ^a	125	57.9 ^b	57	26.4 ^{ab}	21	36.8 ^c

a,b,c: Números com letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente (P < 0.05)

Tabela 2. Taxas de sobrevivência, clivagem, blastocistos *in vitro* e embriões que expressam GFP, após microinjeção com diferentes tampões (TE e SF) contendo DNA a 30 ng / μL, com ou sem incubação em 5 μg / mL de citocalasina B.

Grupo	Embriões n	Taxa Sobrevivência		Taxa Clivagem		Taxa Blastocisto		Embriões GFP+	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Controle	269	-	-	190	70.6 ^a	71	26.4	-	-
TE	525	384	73.1 ^b	245	63.8 ^b	108	28.1	67	62.0 ^a
SF	528	404	76.5 ^b	247	61.1 ^b	92	22.8	35	38.0 ^b
CCB	519	427	82.3 ^a	264	61.8 ^b	121	28.3	61	50.4 ^a
NÃO CCB	534	361	67.6 ^b	228	63.2 ^b	79	21.9	41	51.9 ^a

a,b: Números com letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente (P < 0.05)

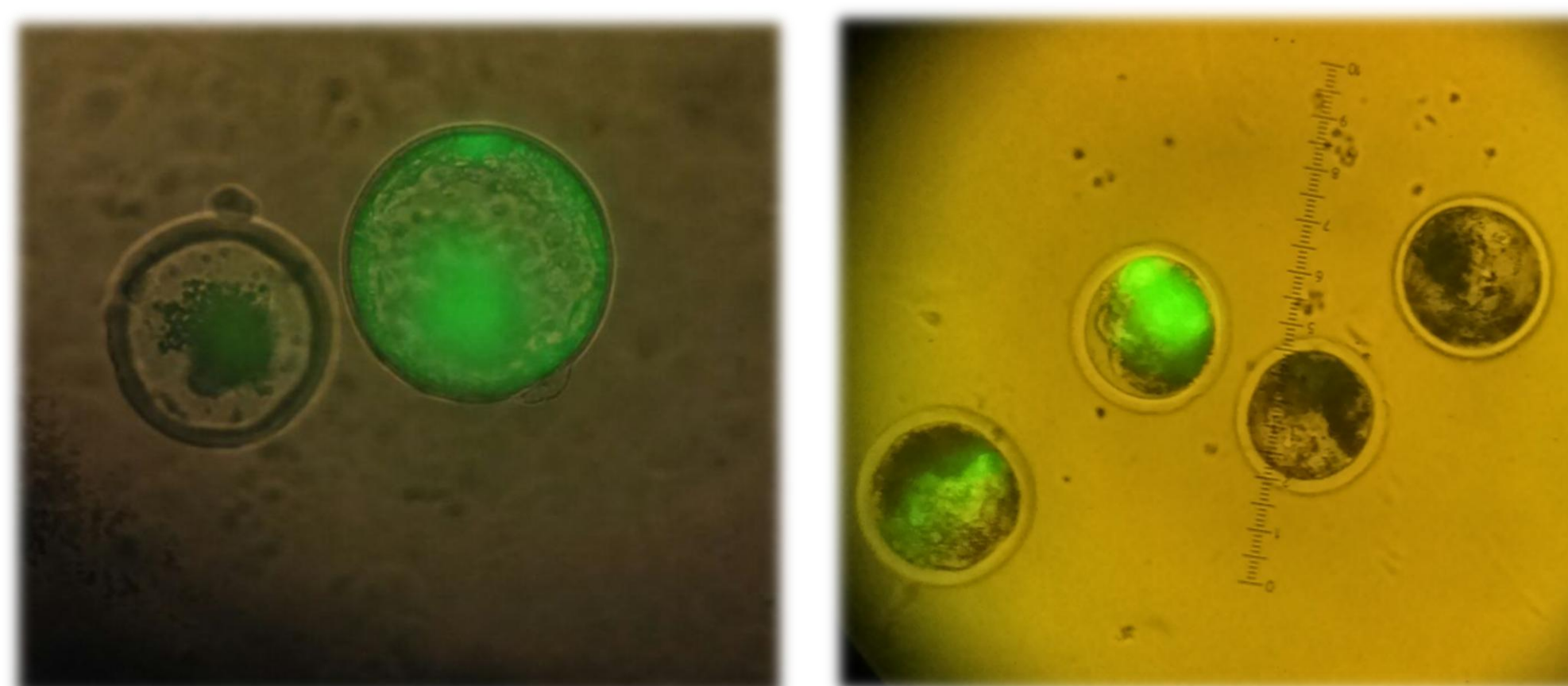


Figura 1. Blastocistos bovinos expressando o gene repórter GFP no Dia 7 de desenvolvimento (GFP +)

CONCLUSÕES

- ✓ A citocalasina B melhorou a sobrevivência após a microinjeção
- ✓ A diluição do DNA no tampão TE melhorou a proporção de embriões que expressam GFP no dia 7
- ✓ TE + CCB melhorou a sobrevivência após microinjeção, clivagem e taxas de blastocistos após o cultivo e a proporção de blastocistos GFP + no dia 7 do desenvolvimento