Ciência e Tecnologia no caminho
da Cooperação Internacional

Análise da sensibilidade da extração de RNA embrionário associada a RT-PCR para detecção de transcritos derivados de blastocistos bovinos após diluições seriadas do cDNA

Vanessa Lamim Lovatel[1], Márcia Sabino[2], Paula Magnelli Mangiavacchi[3], Álvaro Fabrício Lopes Rios[3], Luis Fonseca Matos[1]

IV Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

17º Encontro de IC da UENF
9º Circuito de IC da IFF
5ª Jornada de IC da UFF

UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Medicina Veterinária

RESUMO

A análise da expressão gênica de embriões bovinos produzidos pelas técnicas de superovulação e produção in vitro é de grande importância para a identificação das possíveis alterações provocadas pelos protocolos de reprodução assistida. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a sensibilidade de detecção de transcritos de embriões bovinos produzidos in vitro através da utilização do kit ZR RNA Microprep associado a RT-PCR em diluições seriadas de cDNA. Embriões bovinos foram produzidos in vitro a partir de ovócitos aspirados de ovários de matadouro e fertilizados com sêmen de um mesmo touro. Embriões em estádios de desenvolvimento de blastocisto e blastocisto eclodido foram selecionados e armazenados em meio RNA-later®. O RNA total de amostras contendo 1 blastocisto (contendo cerca de 80 células) e 5 blastocistos eclodidos (cerca de 260 células cada embrião) foi extraído através da utilização do ZR RNA Microprep (ZYMO Research). Cada amostra foi submetida à digestão com 1U de Dnase I (Ambion) para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Com o RNA obtido foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). A detecção dos transcritos foi realizada através de PCR utilizando os primers para o gene da β-actina bovina. As amostras de cDNA de cada RT foram diluídas 1: 10, 1:100 e 1:1000 vezes e subsequentemente utilizadas para realização da PCR. Os resultados obtidos demonstram que o protocolo utilizado conseguiu detectar a presença de transcritos do gene da β-actina bovina de cDNA de blastocistos eclodidos nas diluições 1:10 (±130 células); 1:100 (±13 células) e 1:1000 (±1.3 células). A amplificação do cDNA derivado de um blastocisto único detectou a presença de transcrito nas diluições 1:10 (±8 células) e 1:100 (±0,8 células), mas não na diluição de 1:1000. Esses resultados demonstram uma elevada sensibilidade de recuperação de transcritos do kit ZR RNA Microprep (ZYMO) e sua eficiência na produção de cDNA quando associado a RT-PCR. Os protocolos utilizados nesse es-

ISSN 2177-6180

tudo poderão ser utilizados para análise de expressão de embriões, amostras de biópsias embrionárias com pouco número de células, e até mesmo blastômeros isolados.

PALAVRAS CHAVE: Blastocistos bovinos, Produção in vitro, RNA embrionário

APOIO FINANCEIRO: FAPERJ, CNPq

IV Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

17º Encontro de IC da UENF
9º Circuito de IC da IFF
5ª Jornada de IC da UFF

UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Medicina Veterinária

ISSN 2177-6180