

## SBTE 203 CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

**Efeitos do ambiente de maturação *in vitro* na enucleação de oócitos bovinos para transferência nuclear de células somáticas****A.C.F. Rodrigues<sup>1</sup>; E.D. Souza<sup>2</sup>; T.A. Miyauchi<sup>3</sup>; J.V.P. Rettore<sup>4</sup>; A.O. Bevilaqua<sup>5</sup>; M.M. Pereira<sup>4</sup>; B.C. Carvalho<sup>2</sup>; E.P. Costa<sup>1</sup>; L.S.A. Camargo<sup>2</sup>; L.T. Iguma<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>.Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>.EMBRAPA Gado de leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; <sup>3</sup>.Universidade de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil; <sup>4</sup>.Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil; <sup>5</sup>.Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG, Brasil.

**Palavras-chave:** handmade cloning (HMC); maturação *in vitro* (MIV); oócitos.

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) pelo método de remoção nuclear manual (Handmade Cloning – HMC) é uma técnica que ainda possui eficiência muito baixa. A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos receptores é uma etapa crucial para o processo, pois é quando ocorre a preparação do citoplasma para receber o núcleo doador. Por isso, a busca por um ambiente de maturação eficiente e otimizado parece ser fundamental para o sucesso da técnica. O soro, presente na maioria dos sistemas de MIV, possui componentes indefinidos e em quantidades variáveis que podem prejudicar a padronização dos resultados e o desenvolvimento embrionário/fetal. Estudos prévios, realizados em nosso laboratório com a PIV, revelaram que oócitos maturados em meio livre de soro e com baixa tensão de O<sub>2</sub> produzem embriões de melhor qualidade quando comparados aos maturados em sistema convencional de MIV (Pereira *et al.*, *Reprod. Fertil.and Develop.* 22:1074-1082, 2010). O presente estudo objetivou avaliar a eficiência da enucleação de oócitos receptores submetidos a diferentes sistemas de MIV. Oócitos obtidos de ovários de abatedouro foram divididos em dois tratamentos: T1 (n=116) - oócitos maturados com 10% SFB em atmosfera de 20% de O<sub>2</sub> e T2 (n=124) - oócitos maturados com 0,1% PVA em 5% de O<sub>2</sub>. O meio/condições-base de maturação foi TCM 199 (Invitrogen, Carlsberg, EUA) suplementado com FSH (20 µg/mL), EGF (10 ng/mL), 0,1% de antibióticos, incubação a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Após 19 h de MIV, os oócitos foram desnudados em solução de hialuronidase 0,1% e em seguida foram selecionados os maturados, detectados a partir da expulsão do 1º corpúsculo polar (CP). Oócitos maturados foram tratados com demecolcina (0,5 µg/mL) por 2 h para indução da formação do cone (protrusão) na membrana plasmática (indicador da localização do núcleo). Após esse período, a zona pelúcida foi removida em solução de pronase (2 mg/mL) e, então, os oócitos foram enucleados manualmente, com o auxílio de microlâminas. Foram avaliadas as taxas de extrusão do 1º CP e de formação do cone dos dois tratamentos e os dados comparados pelo teste qui-quadrado. Não houve diferença significativa (P>0,05) tanto na taxa de expulsão do 1º CP (74% e 77%, para T1 e T2, respectivamente) quanto na de formação de protrusão cônica (70% e 58%, para T1 e T2, respectivamente), entre os tratamentos. Esses resultados sugerem que o ambiente de maturação em atmosfera com 5% de O<sub>2</sub> e na ausência de soro pode ser usado em oócitos receptores para clonagem por HMC, sem prejuízo para a extrusão do 1º CP e para a formação de cones metafásicos.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG e EMBRAPA.