

ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DE OVÓCITOS BOVINOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO*: RESULTADOS PRELIMINARES

D. M. CORDEIRO¹; C. BLOCH Jr²; R. RUMPF(rodolfo@cenargen.embrapa.br)

¹UnB; ²Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos tem alcançado grande êxito e vários estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de maximizar as taxas de produção de blastocistos. Além dos aspectos de produção, a PIV é uma excelente ferramenta para a regeneração de germoplasma animal em vias de extinção. A maturação *in vitro* (MIV) representa um fator limitante na obtenção de ovócitos competentes para o desenvolvimento. Por muito tempo, a maturação nuclear foi o parâmetro considerado para a avaliação da maturação ovocitária, mas é sabido que os eventos citoplasmáticos são também essenciais na capacitação do ovócito para o desenvolvimento *in vitro*, embora os mecanismos e moléculas que conferem uma maturação eficaz ainda não sejam completamente conhecidos. Neste sentido, estamos propondo correlacionar o perfil protéico de ovócitos bovinos com a sua classificação morfológica, bem como comparar o padrão protéico de ovócitos oriundos de fêmeas férteis com ovócitos de fêmeas subférteis e imaturas (pré-púberes). A seguir, apresentamos os resultados preliminares obtidos a partir de ovócitos de vacas de abatedouros. Os ovócitos foram selecionados no próprio líquido folicular de acordo com a morfologia, em qualidades: I- ovócitos com 4 ou mais camadas de células do *cumulus*, compactas e uniformes e citoplasma uniforme; II- ovócitos com células do *cumulus* expandidas; III- ovócitos desnudos com citoplasma não homogêneo; IV- ovócitos degenerados. Após a seleção ovócitos imaturos (n=10) de qualidade I e II eram processados em tampão de amostra e aquecidos a 100°C por 10 minutos para eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970; Nature 227, 680-685). Paralelamente, outras amostras de ovócitos de qualidade I e II foram maturados ou não por 24 horas em meio TCM 199 (Gibco) contendo L-glutamina, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco), 24 UI/ml de LH, 10 mg/ml de FSH, 0,005mg/ml de gentamicina, em estufa de CO₂ em ar, a 39°C. Em seguida essas amostras foram preparadas em água mili Q, sonicadas em pulsos alternados de 30 segundos e analisadas pela técnica de MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight). As amostras de ovócitos resolvidas por SDS-PAGE e coradas com prata, mostraram um perfil protéico de massas moleculares variando de 14 a 200kDa. A análise de um *pool* de ovócitos imaturos (n=58) e maduros (n=20) por MALDI-TOF detectou diferentes picos de proteínas, com um espectro de massa variando de 2 a 60 kDa. Os dados obtidos pela eletroforese encontram-se de acordo com os dados da literatura, entretanto, repetições a mais serão necessárias para se obter um perfil protéico característico segundo a qualidade do ovócito e o tempo de maturação. Os espectros de massa obtidos pela técnica de MALDI-TOF confirmaram e acrescentam os dados obtidos pela eletroforese. Em adição, com o propósito de se obter uma melhor resolução e acurácia dos dados obtidos, está sendo usado eletroforese bidimensional para a separação de proteínas e os *spots* protéicos específicos serão analisados pela técnica de MALDI-TOF.

Palavras Chave: Bovino, Ovócitos Maturação, perfil protéico.