

## EFEITO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO CELULAR NA PRODUÇÃO DE CLONES BOVINOS

Perecin, F.<sup>1</sup>; Yamazaki, W.<sup>1</sup>; Ferreira, C.R.<sup>2</sup>; Méo, S.C.<sup>3</sup>; Saraiva, N.Z.<sup>1</sup>; Tetzner, T.A.D.<sup>1</sup>; Garcia, J.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DMVPRA-FCAV/UNESP-Jaboticabal; <sup>2</sup> ZAB-FZEA/USP-Pirassununga; <sup>3</sup> CPPSE-EMBRAPA-São Carlos.  
fperecin@fcav.unesp.br

Os métodos de sincronização da célula doadora de núcleo para uso em clonagem baseiam-se no bloqueio reversível do ciclo celular em pontos específicos. Idealmente, espera-se que esse bloqueio não provoque prejuízo à viabilidade do embrião reconstituído após a transferência de núcleo. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do processo de clonagem (taxa de eletrofusão, produção de blastocistos e estabelecimento de prenhez) a partir de dois protocolos de sincronização celular: privação de soro fetal bovino (SFB) ou cultivo celular até confluência. Oócitos bovinos foram recuperados por aspiração folicular *postmortem* e maturados *in vitro* (MIV) por 18h em TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 1µg/mL FSH, 50µg/mL hCG, 1µg/mL estradiol, 0,2mM piruvato de sódio e 83,4µg/mL amicacina em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C. Oócitos apresentando extrusão do primeiro corpúsculo polar foram selecionados, corados com 10µg/mL de Hoechst 33342 e enucleados em fluido sintético de oviduto (SOF) tamponado com HEPES, suplementado com 10% de SFB e 7,5µg/mL de citocalasina B. A reconstituição oocitária foi realizada com dois grupos de fibroblastos bovinos: Grupo A - cultivados sob privação de SFB por 3 a 5 dias (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM suplementado com 0,5% de SFB); ou Grupo B - cultivados até confluência (DMEM suplementado com 10% de SFB). Conjuntos citoplasto+fibroblasto foram eletrofundidos em solução de manitol 0,28M, com dois pulsos de corrente direta de 2,0Kv/cm e duração de 20µs cada. A ativação foi realizada por exposição à ionomicina (5 minutos, 5µM) seguida de incubação em SOF suplementado com 20mM cloreto de estrôncio e 10µg/mL de citocalasina B por 6 horas. Os prováveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em SOF suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de BSA em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C por 7 dias. Alguns blastocistos de cada grupo foram transferidos para fêmeas receptoras previamente sincronizadas. As taxas de eletrofusão e produção de blastocistos dos dois grupos foram submetidas à ANOVA, com nível de significância de 5%. Houve diferença significativa entre os grupos A e B quanto às taxas de eletrofusão: 33,66%±13,7% (549 fundidos em 1631 reconstituídos) contra 40,07%±11,95% (696 fundidos em 1737 reconstituídos), respectivamente; e quanto ao desenvolvimento até blastocisto: 20,58%±13,84% (113 blastocistos em 549) contra 34,77%±10,47% (242 blastocistos em 696), respectivamente. Tais diferenças proporcionaram produção média de 5,65 e 12,74 blastocistos por sessão de micromanipulação nos grupos A e B, respectivamente. No grupo A não foram diagnosticadas prenhez aos 30 dias em 25 receptoras inovuladas; no grupo B foram diagnosticadas 4 gestações a partir de 11 inovulações (36,4%). Embora a privação de SFB permita o desenvolvimento a termo de clones bovinos (Campbell et al., Nature, 380:64, 1996), existem relatos de maior fragmentação de DNA após utilização da privação (Gibbons et al., Biol Reprod, 66:895, 2002). Ainda, as menores taxas de eletrofusão, produção de blastocistos e estabelecimento de prenhez observadas no grupo A em comparação ao B, indicam que o uso de fibroblastos submetidos à privação de SFB não é justificável para o procedimento de clonagem em bovinos. Apoio Financeiro: FAPESP 03/12352-7 e 04/14884-9.

## EFFECT OF CELL CYCLE SYNCHRONIZATION PROTOCOL ON BOVINE CLONES PRODUCTION

The methods of donor cell synchronization for cloning are based on the reversible block of cell cycle at specific points. Ideally, it's expected that this block do not cause prejudice to embryo's viability after nuclear transfer. This work aimed to evaluate the efficiency of cloning process (electrofusion rates, blastocyst production and gestation establishment) using two protocols of cell synchronization: fetal calf serum (FCS) starvation or cell culture until confluence. Bovine oocytes were recovered through *postmortem* follicular aspiration and were *in vitro* matured (IVM) for 18h in TCM-199 supplemented with 10% FCS, 1µg/mL FSH, 50µg/mL hCG, 1µg/mL estradiol, 0.2mM sodium pyruvate and 83.4µg/mL amicacin at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air and maximum humidity. Oocytes were selected for the presence of first polar body, stained with 10µg/mL Hoechst 33342 and enucleated in synthetic oviduct fluid (SOF) HEPES-buffered, supplemented with 10% FCS and 7.5µg/mL cytochalasin B. Oocyte reconstitution was performed with two groups of bovine fibroblasts: Group A - cultivated under fetal calf serum starvation for 3 to 5 days (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM supplemented with 0.5% of FCS); or Group B - cultivated to confluence (DMEM supplemented with 10% of FCS). Citoplast+fibroblast complex were electrofused in mannitol 0.28M with two pulses of 2.0kV/cm and 20µs each. The oocytes were activated with ionomicyn (5 minutes, 5µM) followed by incubation in SOF supplemented with 20mM of strontium chloride and 10µg/mL of cytochalasin B for 6 hours. Presumably zygotes were co-cultivated with granulosa cells in SOF supplemented with 2.5% of FCS and 0.5% of BSA under atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C and maximum humidity for 7 days. Some blastocysts of each group were transferred to surrogate cows previously synchronized. Electrofusion and blastocyst production rates of both groups were submitted to ANOVA, with 5% of significance level. There were differences between groups A and B considering electrofusion rates: 33.66% ± 13.7% (549 fused out of 1631 reconstituted) versus 40.07%±11.95% (696 fused out of 737 reconstituted), respectively; and development until blastocyst: 20.58%±13.84% (113 blastocysts out of 549) versus 34.77%±10.47% (242 blastocysts out of 696), respectively. Such differences generated an average production of 5.65 and 12.74 blastocysts per micromanipulation section in the groups A and B, respectively. In the group A no pregnancies at 30 days were diagnosed after inovulation in 25 surrogate cows; in the group B, 4 pregnancies derived from 11 inovulations (36.4%) were diagnosed in the day 30 of development. Although serum starvation permits development to term of bovine clones (Campbell et al., Nature, 380:64, 1996) there were reports of higher DNA fragmentation after its use (Gibbons et al., Biol Reprod, 66:895, 2002). Moreover, the lowest electrofusion, blastocysts production and pregnancies establishment rates observed in the group A compared to B, indicate that the use of fibroblasts submitted to serum starvation is not justifiable in the production of bovine clones.