



ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE ENUCLEAÇÃO E TRANSFERÊNCIA NUCLEAR PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS CLONADOS

Jefferson Thadeu Santos de Oliveira, Luis Fonseca Matos, Angelo José Burla Dias

A clonagem por transferência nuclear representa um dos maiores avanços obtidos no campo da biotecnologia animal. Em mamíferos, o primeiro nascimento de um animal clonado empregando células diferenciadas adultas só foi realizado com sucesso em 1997, com o nascimento da ovelha Dolly. O objetivo deste projeto é estabelecer uma técnica de produção de embriões bovinos por meio de injeção intracitoplasmática de células do cumulus com piezo manipulador, comparando-se a injeção da célula inteira com a célula com membrana rompida, seguida da ativação com Ionomicina e 6-DMAP dos embriões reconstruídos. Os ovários serão coletados de vacas mestiças de abatedouro e levados ao laboratório, onde os complexos cumulus-ovócito (COCs) serão recuperados. Apenas os ovócitos de qualidade 1 e 2 serão utilizados. Os COCs selecionados serão transferidos para o meio de maturação *in vitro*, em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂, por 22h. Após a maturação *in vitro*, os COCs serão desnudados em uma gota de 100 µl de meio de desnudamento, em seguida lavados em meio de lavagem e transferidos para gotas de 20 µl de meio de micromanipulação em placa de petri, sendo adicionado óleo mineral para cobrir as gotas. A enucleação será feita aspirando-se uma pequena porção do citoplasma que encontra-se próximo ao primeiro corpúsculo polar. Após a enucleação, os citoplastos resultantes serão colocados em TCM199 com 10% de SFB e seguirão para a transferência nuclear. Células da granulosa serão colhidas a partir de ovócito de matadouro de grau 1, e passadas em gradiente de Percoll e cultivadas em estufa durante 3 dias. Uma célula do cumulus será aspirada e transferida íntegra para o interior do citoplasma do ovócito enucleado. Outro grupo de tratamento será feito rompendo-se a membrana na célula antes da sua injeção, aspirando-a para dentro e para fora da pipeta de injeção até que a membrana seja rompida. A ativação dos embriões reconstruídos será feita pelo protocolo de Ionomicina + 6-DMAP. Os embriões serão então lavados em TCM/ SFB e mantidos em estufa por 4 h em meio TCM/ BSA. Após este período, eles serão transferidos para uma gota de TCM/ BSA e mantidos em estufa por mais 3h. Posteriormente, serão novamente lavados em TCM/ SFB, seguindo-se então o cultivo em meio SOF por 9 dias. Espera-se com este trabalho estabelecer uma metodologia eficiente para a produção de embriões clonados bovinos por transferência nuclear.

Palavras-chave: Transferência nuclear, Enucleação, Clonagem bovina.

Instituições de fomento: UENF, CNPq e FAPERJ.