

Estabelecimento do Protocolo de Ativação Partenogenética e Cultivo *in vitro* 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 no campo da biotecnologia animal. Uma das etapas mais críticas na clonagem é a ativação partenogenética e o cultivo *in vitro* de embriões, já que na fertilização *in vitro* cerca de apenas 40% dos oócitos submetidos à técnica se tornam embriões, sendo essa taxa ainda menor no processo de clonagem. O objetivo desse trabalho é estabelecer um protocolo de ativação partenogenética e cultivo *in vitro*, para a produção de embriões bovinos clonados por meio da técnica de transferência nuclear. Ovários foram coletados de vacas mestiças de abatedouro e levados ao laboratório, onde os complexos cumulus-ovócito (COCs) foram recuperados. COCs de qualidade 1 e 2 foram selecionados e maturados em estufa com ar umidificado a 38,5°C, 5% de CO₂, por 22h. Após os oócitos completarem a maturação, o sêmen foi descongelado e submetido ao gradiente de minipercoll. Os ovócitos foram separados em grupos de 20 por gota de meio FIV – final, inseminados por 18 horas e os zigotos colocados em cultivo *in vitro* por 8 dias. Foram feitos 3 grupos de tratamento: cultivo convencional utilizando as células do *cumulus* aderidas ao zigoto para a formação da monocamada (Grupo 1), cultivo onde células do *cumulus* foram adicionadas a gota de cultivo para a formação da monocamada de células do cumulus (Grupo 2) e um terceiro grupo de tratamento no qual os ovócitos foram retirados da gota de maturação, desnudados em hialuronidase e lavados em H-SOF, ativados com o protocolo de Ionomicina 6-DMAP e colocados em SOF para o cultivo *in vitro* em estufa com ar umidificado temperatura de 38,0 °C e 5% de CO₂ por 8 dias (Grupo 3 - ativação partenogenética). A produção de embriões por ativação partenogenética se mostrou menos eficiente (16,1% de blastocisto), comparada com a fertilização *in vitro* em cultivo em monocamada (42,9% de blastocisto) e cultivo sem monocamada (26,0% de blastocisto). Concluímos que a adição de células do *cumulus* para formação de monocamada proporcionou uma taxa de blastocisto superior ao cultivo sem a adição. Apesar do protocolo de ativação partenogenética permitir a obtenção de embriões de boa qualidade, a ativação resultou em uma menor taxa de blastocisto em relação à fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Clonagem Bovina, Partenogênese, Cultivo *in vitro*.

Instituição de fomento: UENF, CNPq e FAPERJ.