

109

TAXAS DE CLIVAGEM E DE FLUORESCÊNCIA EM EMBRIÕES MURINOS MICROINJETADOS COM pOCT-4/EGFP¹ Duarte, M.E.S.; Azambuja, R.M.; Rodrigues, J.L. (Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução- Faculdade de Veterinária, UFRGS).

O objetivo deste experimento foi determinar a taxa de clivagem de embriões murinos microinjetados com DNA exógeno e o percentual de embriões que efetivamente incorporam este DNA exógeno nas suas células. O DNA injetado consistia da seguinte construção gênica: pOCT-4-EGFP/neo. O promotor Oct-4 é composto por um fragmento genômico modificado de 18Kb, o qual reproduz de forma fiel o padrão de expressão endógeno, restrito as linhagens germinativas em embriões murinos no estágio de pré-implantação e células primordiais gonadais. O vetor EGFP (enhanced green fluorescent protein) permite observar sob a luz ultra violeta a incorporação do DNA nas células embrionárias. Os oócitos fertilizados eram coletados em PBS acrescido de 10% soro fetal bovino, 4 horas após a identificação de presença de placa na vagina das fêmeas *Mus domesticus domesticus* da linhagem CF1. Os zigotos eram então colocados em uma solução de PBS contendo 300 g/ml de hialuronidase durante aproximadamente 30 segundos para a remoção das células do *Cumulus oophorus* e mantidos em PBS durante o procedimento de microinjeção. Aqueles embriões que não degeneraram durante este procedimento eram então cultivados em CZB (Chatot et al., 1989) ou M16 (Whittingham, 1971) durante 2-4 dias em estufa, com atmosfera de 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa do ar. A incorporação do DNA exógeno ao genoma das células embrionárias foi analisada pela presença de fluorescência frente à excitação, através da luz UV, dos zigotos e dos blastocistos. Embriões não injetados eram utilizados como grupo controle. A taxa de clivagem foi de 82,5% (66/80) e 80,9% (51/63), respectivamente para zigotos microinjetados e controle. Não houve uma diferença significativa (p 0,05) entre os dois grupos. Em 20% (16/80) dos zigotos injetados foi observada fluorescência, quando estes eram visualizados em microscópio ótico sob luz ultra violeta, enquanto que nos zigotos do grupo controle, nenhuma fluorescência pode ser observada. Os zigotos microinjetados que agregaram o DNA exógeno ao genoma, transmitiram-no as demais células durante as clivagens, até o estágio de blastocisto. (PIBIC/CNPq- FAPERGS)