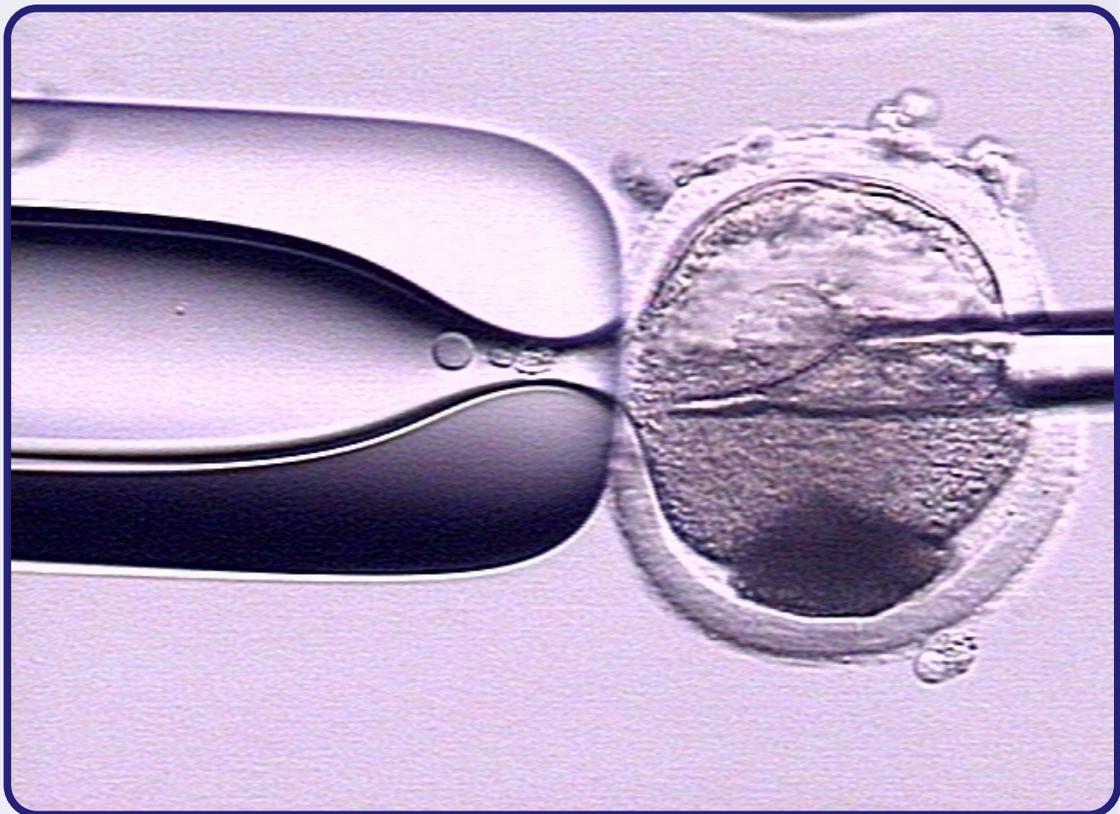


Desenvolvimento embrionário, visualização de pronúcleos e transferência pronuclear após centrifugação de zigotos bovinos em meio com citocalasina



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11

Desenvolvimento embrionário, visualização de pronúcleos e transferência pronuclear após centrifugação de zigotos bovinos em meio com citocalasina

Simone Cristina Méo¹
Christina Ramires Ferreira²
Felipe Perecin³
Walt Yamazaki⁴
Cláudia Lima Verde Leal⁵
Flávio Vieira Meirelles⁶
Joaquim Mansano Garcia⁷

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3361-5611

Fax: (16) 3361-5754

Home page: www.cppse.embrapa.br

E-mail: sac@cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alberto C. de Campos Bernardi

Secretário-Executivo: Edison Beno Pott

Membros: Carlos Eduardo da Silva Santos, Maria Cristina C. Brito,

Odo Primavesi, Sônia Borges de Alencar

Revisor de texto: Edison Beno Pott

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Figura da capa:

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

1ª edição on-line (2007)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP Embrapa Pecuária Sudeste

Simone Cristina Méo

Desenvolvimento embrionário, visualização de pronúcleos e transferência pronuclear após centrifugação de zigotos bovinos em meio com citocalasina [Recurso eletrônico] / Simone Cristina Méo [et al.] — São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

Modo de Acesso: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/Boletim11.pdf/view>>

Título da página da Web (Acesso em 27 de fevereiro de 2008)

34 p. — (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pecuária Sudeste, 11).

ISSN 1981-2078

1. Desenvolvimento embrionário - Pronúcleos - Zigotos - Bovinos - Citocalasina I. Méo, Simone Cristina. II. Ferreira, Christina Ramires. III. Percin, Felipe. IV. Yamazaki, Walt. V. Leal, Cláudia Lima Verde. VI. Meirelles, Flávio Vieira. VII. Garcia, Joaquim Mansano. VIII. Título. IX. Série.

CDD 636.0824

Sumário

Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	21
Conclusão	31
Agradecimentos	31
Referências Bibliográficas	32

Desenvolvimento embrionário, visualização de pronúcleos e transferência pronuclear após centrifugação de zigotos bovinos em meio com citocalasina

*Simone Cristina Méo¹
Christina Ramires Ferreira²
Felipe Perecin³
Walt Yamazaki⁴
Cláudia Lima Verde Leal⁵
Flávio Vieira Meirelles⁶
Joaquim Mansano Garcia⁷*

Resumo

Após a fecundação, o genoma é influenciado pelo citoplasma do oócito e essa interação nucleocitoplásmica pode ser avaliada por meio da transferência pronuclear entre zigotos. Com o objetivo de realizar a transferência de pronúcleos em bovinos, foram avaliadas as condições de centrifugação (15.000 ou 18.000 *g* por 5 ou 15min, em meio com 10 µg/mL de citocalasina D) e os efeitos da melhor condição de centrifugação (15.000 *g* por 15min) sobre o desenvolvimento embrionário e sobre o potencial de visualização dos pronúcleos.

¹ Médica Veterinária, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Endereço eletrônico: <simone@cnpse.embrapa.br>.

² Médica Veterinária, Doutora, Pós-doutoranda do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP. Endereço eletrônico: christina.ferreira@posgrad.fcav.unesp.br>.

³ Médico Veterinário, Doutor, Pós-doutorando da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP. Endereço eletrônico: <fperecin@fcav.unesp.br>.

⁴ Médico Veterinário, Doutor, Diretor-Presidente da Bioembryo Biotecnologia da Reprodução Animal Ltda., Bauru, SP. Endereço eletrônico: <wymazaki@yahoo.com>.

⁵ Médica Veterinária, Doutora, Professora Doutora da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP. Endereço eletrônico: <clvleal@usp.br>.

⁶ Médico Veterinário, Doutor, Professor Assistente Doutor da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP. Endereço eletrônico: <meirelff@usp.br>.

⁷ Médico Veterinário, Doutor, Professor Assistente Doutor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP. Endereço eletrônico: <jmgarcia@fcav.unesp.br>.

Para tanto, oócitos bovinos maturados e fecundados *in vitro* foram centrifugados e destinados ao cultivo. A centrifugação, adequada para o fracionamento do citoplasma, não afetou ($P > 0,05$) as taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, respectivamente, nos embriões centrifugados (71,2% e 15,1%) em comparação aos não centrifugados (67,7% e 17,8%). Entretanto, a centrifugação não permitiu a visualização dos pronúcleos em todos os zigotos, uma vez que zigotos sem pronúcleos visíveis clivaram e se desenvolveram até blastocisto (64,1% e 5,9%) de maneira semelhante ($P > 0,05$) aos zigotos com pronúcleos visíveis (69,6% e 21,7%). Em comparação aos embriões não manipulados, a transferência pronuclear prejudicou ($P < 0,05$) as taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (56,2% e 2,2%). Assim, novos estudos são necessários para o aperfeiçoamento da técnica de transferência pronuclear em zigotos bovinos produzidos *in vitro* visando a melhores taxas de desenvolvimento embrionário.

Termos para indexação: *Bos taurus*, *Bos indicus*, oócitos, embriões, centrifugação, transferência pronuclear, desenvolvimento embrionário.

Embryonic development, pronuclear visualization, and pronuclear transfer after centrifugation of bovine zygotes in cytochalasin-containing media

Abstract

After fertilization the embryonic genome is influenced by ooplasmic factors and this nuclear-cytoplasmic interaction can be assessed by pronuclear transfer between zygotes. Aiming to perform pronuclear transfer procedures in cattle, centrifugation conditions (15,000 or 18,000 g for 5 or 15min in 10 µg/mL of cytochalasin-containing media) and effects of the most efficient condition of centrifugation (15,000 g for 15min) on embryonic development and on the ability to visualize the pronuclei were evaluated. For that purpose, in vitro matured and fertilized bovine oocytes were centrifuged and submitted to culture. Centrifugation allowed appropriate cytoplasm fractionation and it was not detrimental ($P>0.05$) for cleavage and for blastocyst development, respectively, in centrifuged embryos (71.2% and 15.1%) when compared to non-centrifuged ones (67.7% and 17.8%). However, centrifugation did not assure pronuclear visualization in all zygotes, since some

zygotes without a visible pronucleus cleaved and reached the blastocyst stage (64.1% and 5.9%) in similar rates ($P > 0.05$) to zygotes with a visible pronucleus (69.6% and 21.7%). Pronuclear transfer technique affected ($P < 0.05$) cleavage and blastocyst development rates, respectively, when manipulated embryos (56.2% and 2.2%) were compared to control non-manipulated ones. Thus, it is necessary to search for new strategies of pronuclear transfer in bovine embryos produced in vitro, in order to improve developmental rates.

Indexing terms: *Bos taurus*, *Bos indicus*, oocyte, embryo, centrifugation, pronuclear transfer, embryonic development.

Introdução

A fecundação une dois gametas com diferentes características celulares e moleculares: o espermatozóide (gameta masculino) e o oócito (gameta feminino). Os gametas modificam-se mutuamente e desencadeiam alterações essenciais para o desenvolvimento do embrião. Uma vez que as interações entre o genoma materno e o genoma paterno, e entre ambos os genomas e o citoplasma do oócito ocorrem imediatamente após a fecundação, as modificações resultantes podem ser estudadas pela transferência pronuclear entre zigotos. Por meio dessa técnica, é possível avaliar a influência da interação nucleocitoplásmica sobre o desenvolvimento embrionário (McGrath & Solter, 1986) e sobre os mecanismos de herança mitocondrial (Meirelles & Smith, 1997). Além disso, a transferência pronuclear é utilizada em procedimentos de reclonagem ou de transferência nuclear seriada (Peura & Trounson, 1998) e na produção de embriões ginogenéticos e androgenéticos para o estudo do *imprinting* genômico (Hagemann et al., 1998).

A técnica de transferência pronuclear é bastante aplicada em camundongos (Barton et al., 1984; Meirelles & Smith, 1997; Liu et al., 2001; Han et al., 2005), nos quais os pronúcleos são claramente visíveis. No entanto, os oócitos de ruminantes, em razão da opacidade do citoplasma decorrente do elevado conteúdo lipídico (Westhusin & de Azambuja, 1996; Nagashima et al., 1997; Hagemann et al., 1998), requerem uma técnica prévia à transferência pronuclear, para a

visualização dos pronúcleos sem a coloração: a centrifugação (Wall, 2001). A centrifugação permite a visualização dos pronúcleos para a realização de procedimentos de transferência pronuclear e de transgênese por injeção pronuclear de DNA, em bovinos (Wall, 2001).

Neste trabalho, as condições de centrifugação e de micromanipulação foram padronizadas para a aplicação da técnica de transferência pronuclear em zigotos bovinos produzidos *in vitro*. Os efeitos da centrifugação e da transferência pronuclear sobre o desenvolvimento embrionário foram avaliados. Para tanto, a técnica de centrifugação para a visualização dos pronúcleos e para a realização da transferência pronuclear e o protocolo de preparo das micropipetas e do sistema de micromanipulação foram descritos.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micromanipulação de Embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em Jaboticabal, SP.

Coleta de oócitos e maturação in vitro

Ovários bovinos obtidos no Frigorífico Barra Mansa, localizado em Sertãozinho, SP, foram coletados imediatamente após a remoção do aparelho reprodutor e transportados ao laboratório em solução salina entre 28 e 32°C. Os folículos

antrais com diâmetro de 3 a 7 mm foram aspirados por agulha de 18-G adaptada a seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50 mL e decantado por 15min para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de Petri e visualizado em microscópio estereoscópico. Os oócitos de *cumulus* compacto e com pelo menos duas camadas de células foram selecionados e maturados *in vitro*, em grupos de 20 a 25, em gotas de 100 µL de meio de maturação *in vitro*; as gotas foram cobertas por óleo mineral. Na maturação *in vitro* foi utilizado o meio de cultura de tecidos 199 com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1,0 µg/mL de hormônio folículo-estimulante (Pluset[®]), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor[®]), 1,0 µg/mL de estradiol, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina. A maturação *in vitro* foi realizada pelo período de 24h, à temperatura de 38,5°C e na atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Fecundação in vitro

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada 24h após o início da maturação. Os oócitos, em grupos de 20 a 25, foram dispostos em gotas de 100 µL de meio com albumina, lactato e piruvato de Tyrode (TALP-FIV – TALP com 30 µg/mL de heparina, 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina), suplementado com 0,2 mM de piruvato, 83,4 µg/mL de amicacina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina; as gotas foram cobertas com óleo mineral. O sêmen, congelado em

palhetas de 0,5 mL, foi aquecido a 35°C por 30seg e submetido a duas centrifugações a 95 *g*, de 5min cada, em 2 mL de meio TALP-sêmen (TALP com 10 mM de HEPES¹). Recuperaram-se 30 µL do sedimento, que foram avaliados quanto ao volume, à concentração e à motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25 x 10⁶ espermatozóides vivos por mililitro, com meio TALP-FIV. Posteriormente, 4 µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas que continham os oócitos, para obtenção da concentração final de 1 x 10⁵ espermatozóides vivos por gota de 100 µL de meio (equivalente a 1 x 10⁶ espermatozóides/mL). O período de co-incubação, a 38,5°C e a 5% de CO₂ em ar, foi de 22 a 24h para a padronização da centrifugação, para a produção de embriões-controle e para a transferência pronuclear. Após esse intervalo, as células do *cumulus* foram removidas por pipetação.

Condições de centrifugação

A centrifugação é utilizada para a separação do conteúdo lipídico e para a visualização dos pronúcleos. Para tanto, oócitos bovinos maturados e fecundados *in vitro* foram depositados em microtubos de 1,5 mL com 250 µL de fluido sintético de oviduto (SOF) tamponado com HEPES (HSOF, com 5 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 10 mM de HEPES sódico e 10% de soro fetal bovino) e 10 µg/mL de citocalasina D; a seguir, foram centrifugados a 15.000 ou 18.000 *g*, em centrífuga *Hettich Zentrifugen Universal 32R*, por

¹ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (ácido etanossulfônico de 4-2 hidroxietil-piperazina-1).

5 ou 15min a 25°C. A citocalasina, que é um agente inibidor de microfilamentos (filamentos de actina), foi utilizada para prevenir a lise dos embriões durante a centrifugação.

Efeito da centrifugação sobre o desenvolvimento embrionário e sobre o potencial de visualização dos pronúcleos

Para a avaliação dos efeitos da centrifugação (15.000 *g* por 15min) em meio que continha citocalasina (10 µg/mL) sobre o desenvolvimento embrionário posterior, embriões não centrifugados e embriões centrifugados entre 14 e 18h após a fecundação (hpf) foram destinados ao cultivo *in vitro*. Para a determinação do potencial de visualização dos pronúcleos, embriões com ou sem pronúcleos visíveis após centrifugação entre 24 e 30hpf foram cultivados.

Cultivo in vitro

O cultivo de desenvolvimento foi realizado em gotas de 100 µL de SOF, suplementado com 0,9 mM de L-glutamina, 2% de solução de aminoácidos essenciais (*Eagle's basal medium*), 1% de solução de aminoácidos não-essenciais (*Eagle's minimum essential medium*), 2,5% de soro fetal bovino e 3 mg/mL de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos, em co-cultivo com células da granulosa, à temperatura de 38,5°C e na atmosfera úmida de 5% de CO₂ em ar. A cada 48h, foi realizada a substituição de 50 µL das gotas de desenvolvimento por SOF recém-preparado. A clivagem foi avaliada, sob microscópio estereoscópico, entre 46 e 48hpf e a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi observada após sete dias.

Preparo das pipetas de micromanipulação

As pipetas de prensão e de injeção foram preparadas com base em capilares de borossilicato (1,0 mm de diâmetro externo, 0,75 mm de diâmetro interno e 10 cm de comprimento). Para a produção da pipeta de prensão (Figura 1), o capilar foi esticado manualmente, em bico de Bunsen (Figura 1a), e cortado em microforja (aumento de 80 vezes), ao diâmetro externo de 100 a 150 μm (Figuras 1b, c, d). A extremidade da pipeta de prensão foi estreitada pela ação do calor até atingir o diâmetro interno de 25 μm (Figuras 1e, f), com posterior execução de duas dobras opostas na pipeta (Figuras 1g, h, i) a fim de permitir seu posicionamento na câmara de micromanipulação.

Para a pipeta de injeção (Figura 2), o capilar foi esticado em *P-2000 Micropipette Puller* (Figura 2a), programado com as seguintes variáveis: aquecimento = 500, filamento = 4, velocidade = 50, atraso = 225, tração = 150 (Figuras 2b, c). Na microforja (aumento de 80 vezes), a pipeta foi cortada ao diâmetro externo de 25 μm (Figuras 2d, e). Em seguida, foi posicionada em esmerilhador *EG-40 Micropipette Grinder* em ângulo de 60°, à velocidade 60 rpm e pressão positiva com auxílio de seringa (Figura 2f), para a confecção do bisel (Figuras 2g, h). A remoção de resíduos de vidro do interior da pipeta foi realizada, ainda sob pressão positiva com a seringa, mediante imersão em ácido fluorídrico, seguida de banho em água deionizada (ambos repetidos por cinco vezes). Posteriormente, foi feita uma ponta na extremidade do bisel (Figura 2i) para permitir a perfuração da zona pelúcida dos zigotos com maior facilidade.

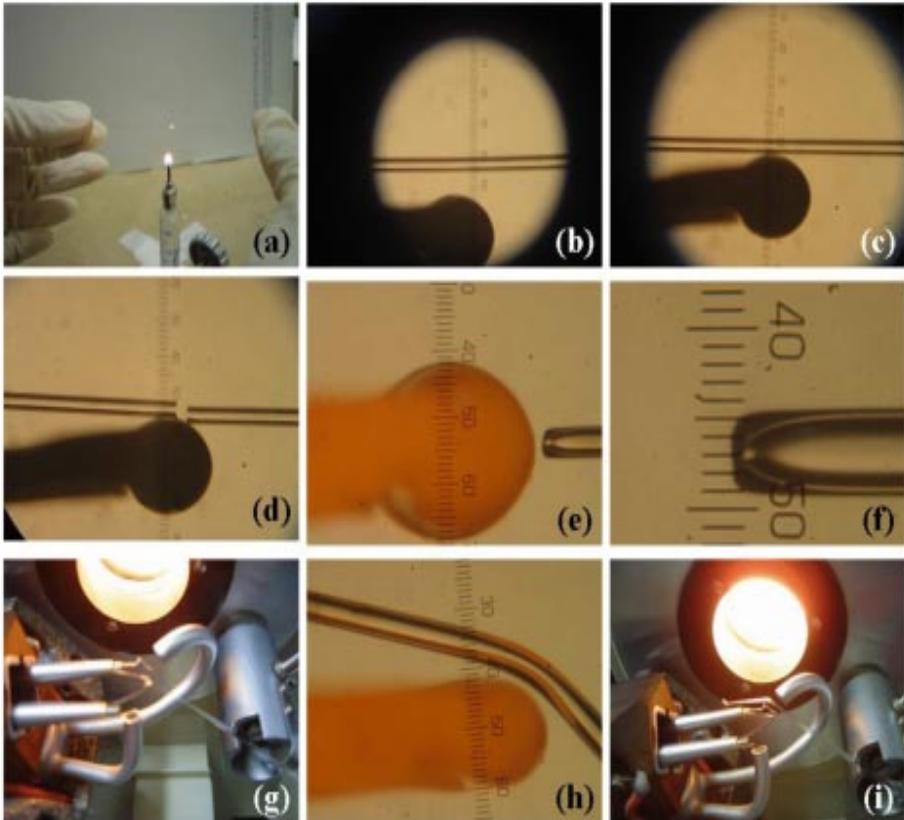


Figura 1. Preparo da pipeta de prensão. (a) Estiramento manual do capilar em bico de Bunsen; (b) mensuração do diâmetro externo do capilar em 100 a 150 μm (quatro a seis espaços na régua); (c) aproximação do capilar à esfera de vidro presente no filamento; (d) quebra espontânea do capilar após resfriamento do filamento; (e) estreitamento da extremidade da pipeta por aproximação à esfera de vidro do filamento aquecido; (f) extremidade da pipeta com diâmetro interno de 25 μm ; (g) realização da primeira dobra na pipeta por (h) aproximação ao filamento aquecido; (i) realização da segunda dobra na pipeta.

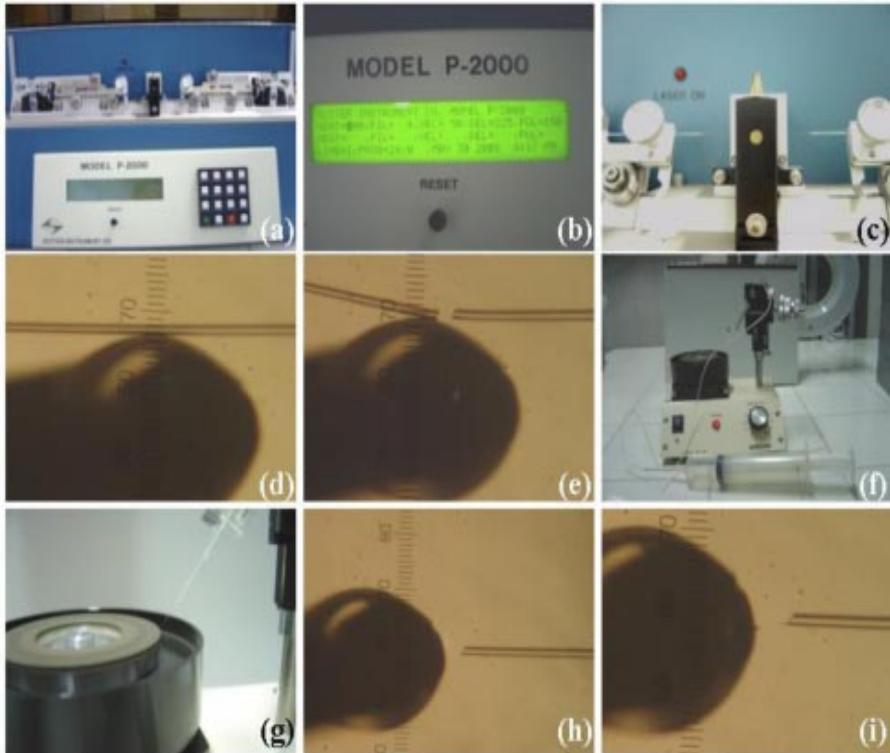


Figura 2. Preparo da pipeta de injeção. (a) Esticador automático de pipeta *P-2000 Micropipette Puller*; (b) variáveis no esticador automático; (c) capilares após estiramento; (d) mensuração do diâmetro externo do capilar em 25 µm e aproximação do capilar à esfera de vidro incandescente presente no filamento; (e) quebra espontânea do capilar após resfriamento do filamento; (f) acoplamento do capilar ao esmerilhador *EG-40 Micropipette Grinder* sob pressão positiva com auxílio de seringa; (g) capilar no esmerilhador para a confecção do bisel; (h) aproximação da ponta do bisel à esfera de vidro no filamento; (i) ponta feita na extremidade do bisel.

Transferência pronuclear

Para a transferência pronuclear, entre 24 e 30h após o início da inseminação dos oócitos, zigotos de FIV foram centrifugados a 15.000 *g* por 15min, nas condições descritas anteriormente. Aqueles com pronúcleos visíveis foram destinados ao cultivo (FIV controle) ou à técnica de transferência pronuclear (TP-FIV), descrita por McGrath & Solter (1984b), em camundongos, e por Westhusin & de Azambuja (1996), em bovinos. Para a produção do grupo TP-FIV, os zigotos centrifugados foram transferidos para a câmara de micromanipulação com HSOF que continha 7,5 µg/mL de citocalasina B coberto por óleo mineral; a câmara foi montada sobre a tampa de uma placa de poliestireno de 60 mm, em platina aquecedora a 38°C de microscópio óptico invertido *Olympus IX-70* equipado com *Hoffman Modulator Contrast* e micromanipuladores (Figura 3). Utilizaram-se duas pipetas de prensão e uma pipeta de injeção. A técnica de transferência pronuclear consistiu na remoção dos pronúcleos de um embrião e na posterior injeção no espaço perivitelínico do mesmo embrião (grupo TP-FIV; Figuras 4 e 5).

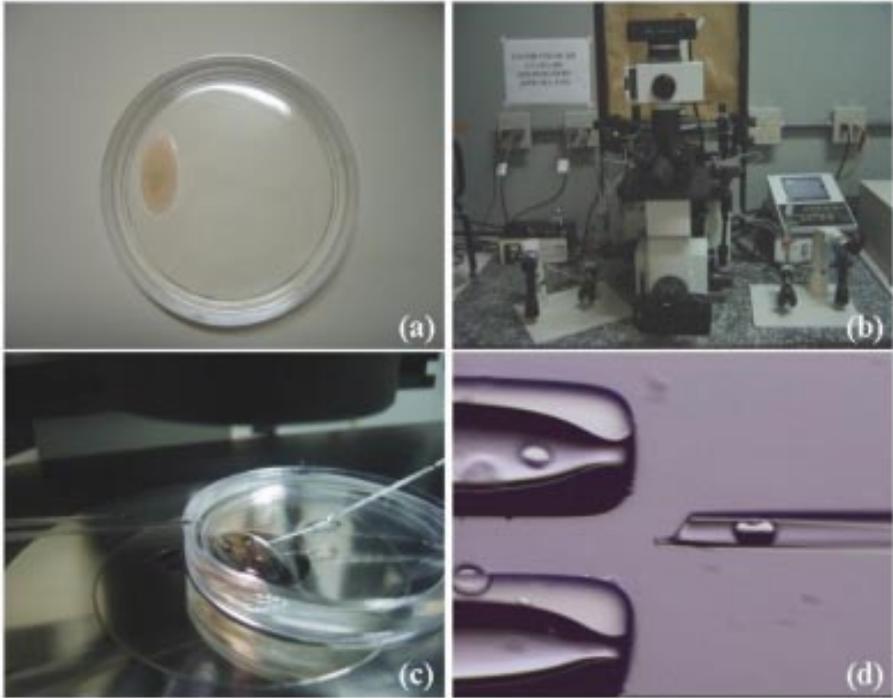


Figura 3. Preparo e montagem da câmara de micromanipulação. (a) Câmara de micromanipulação com gota de fluido sintético de oviduto tamponado com ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina (HEPES) coberta por óleo mineral; (b, c) microscópio invertido com câmara de micromanipulação, duas pipetas de prensão à esquerda e uma pipeta de injeção à direita; (d) visualização das extremidades das pipetas de prensão e de injeção sob microscopia.

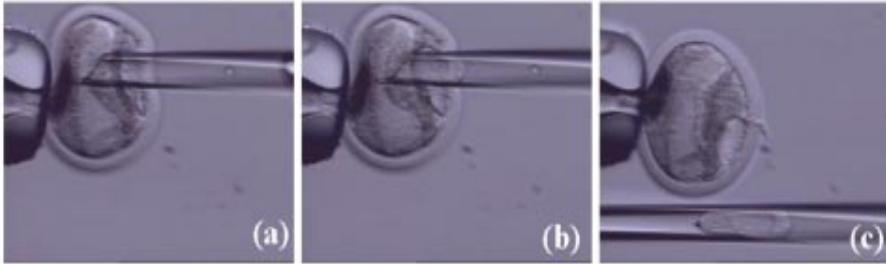


Figura 4. Procedimento de enucleação de zigoto para transferência pronuclear. (a, b) Aspiração do pronúcleo para o interior da pipeta de injeção; (c) pronúcleo aspirado e citoplasma adjacente no interior da pipeta de injeção e zigoto enucleado preso à pipeta de prensão.

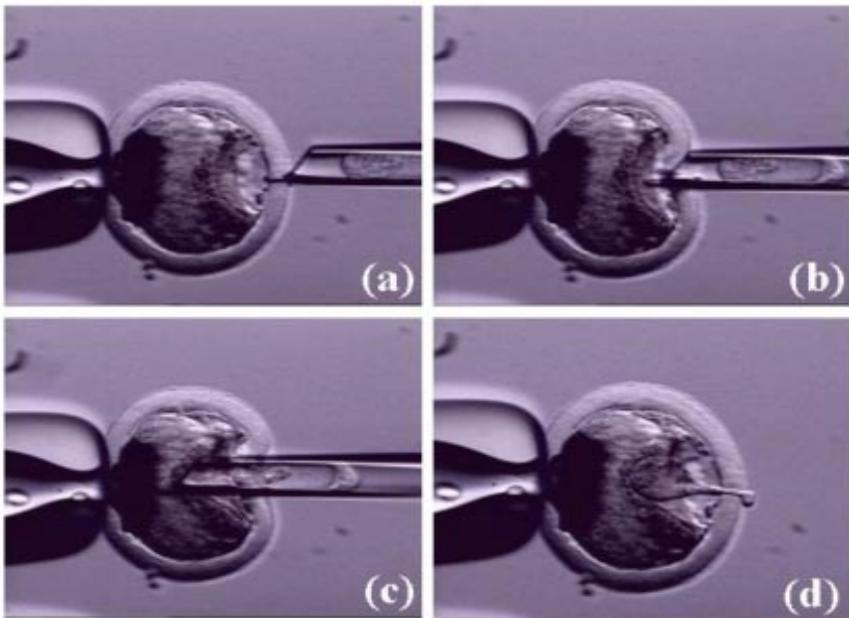


Figura 5. Procedimento de injeção de pronúcleo para a transferência pronuclear. (a) Aproximação da pipeta de injeção, com um pronúcleo em seu interior, ao zigoto enucleado fixo à pipeta de prensão; (b, c) transferência do pronúcleo do interior da pipeta de injeção para o zigoto enucleado; (d) pronúcleo transferido no interior do zigoto reconstituído.

Após a transferência, os zigotos foram reconstituídos, ou seja, os pronúcleos foram unidos ao citoplasma receptor por eletrofusão: dois pulsos de corrente direta de 1,5 kV/cm (30 V) por 30 μ seg, em solução de manitol (0,28 mM de manitol, 0,1 mM de CaCl₂.2H₂O, 0,1 mM de MgSO₄.7H₂O e 3 mg/mL de albumina sérica bovina), em câmara *Eppendorf* (distância entre pólos de 200 μ m), no equipamento *BTX Electrocell Manipulator 2001* (Figura 6).

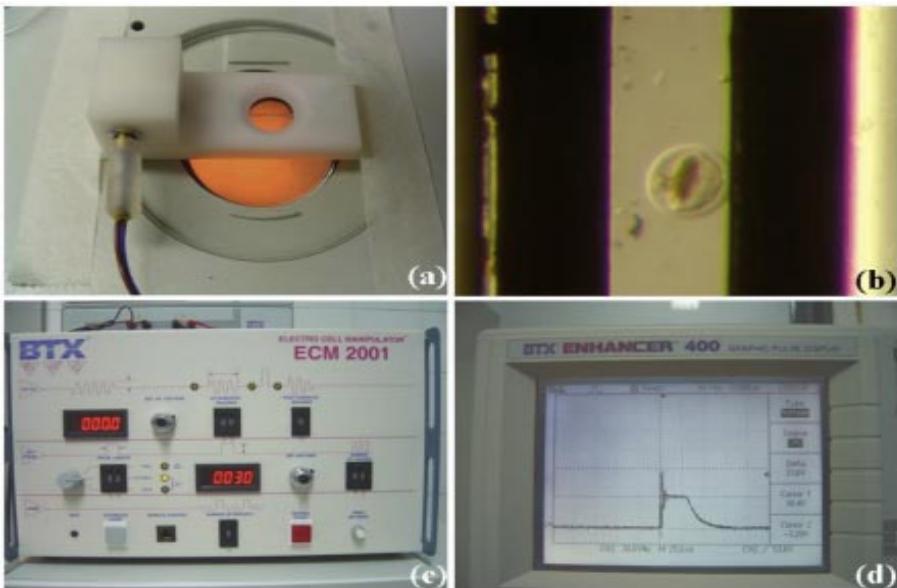


Figura 6. Eletrofusão. (a) Câmara de eletrofusão; (b) posicionamento do zigoto reconstituído entre os eletrodos da câmara de eletrofusão: pronúcleo transferido à esquerda e citoplasma receptor à direita; (c) variáveis utilizadas para programação do equipamento de eletrofusão *BTX Electrocell Manipulator 2001* para aplicação de dois pulsos de corrente direta de 30 V (1,5 kV/cm) por 30 μ seg; (d) mensuração do pulso aplicado (aproximadamente, 30 V) pelo *BTX Enhancer*.

Análise estatística

As taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto foram avaliadas pelo teste de χ^2 ou, quando apropriado, pelo teste exato de Fisher, no SAS (versão 8,2), ao nível de significância de 5% (Méo et al., 2007).

Resultados e discussão

Condições de centrifugação

A centrifugação dos zigotos bovinos, em meio que continha citocalasina D, foi imprescindível para a visualização dos pronúcleos. Para avaliar a força adequada, os zigotos foram, inicialmente, centrifugados a 15.000 ou 18.000 *g* por 5min, mas não houve separação satisfatória do conteúdo citoplasmático (Figura 7a). Posteriormente, a utilização de 15.000 *g* por 15min proporcionou resultados mais eficientes (Figura 7b) e essas condições foram estabelecidas para os procedimentos seguintes.

Nos zigotos, pôde ser observado o padrão de separação dos componentes citoplasmáticos em quatro frações: 1) gotas de lipídeos; 2) vesículas delimitadas por retículo endoplasmático liso; 3) matriz citoplasmática sem organelas; e 4) mitocôndrias (Figura 7b).

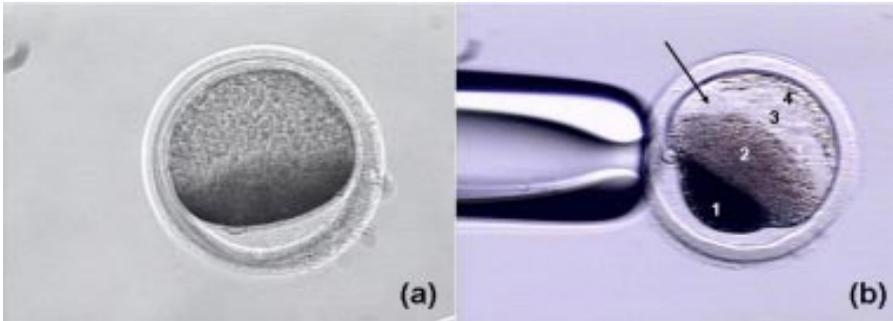


Figura 7. Zigotos bovinos submetidos à centrifugação a 15.000 *g* por (a) 5min e por (b) 15min para separação do conteúdo lipídico e para visualização do pronúcleo (seta). (b) Conteúdo citoplasmático separado em: 1) gotas de lipídeos e grandes vacúolos; 2) vesículas pequenas delimitadas por retículo endoplasmático liso; 3) matriz citoplasmática sem organelas; 4) mitocôndrias (classificado segundo Cran, 1987; Maddox-Hyttel et al., 2004).

Em bovinos, diversos protocolos de centrifugação de zigotos já foram utilizados com sucesso, tais como, 15.000 *g* por 3min (Westhusin & de Azambuja, 1996), 12.000 *g* por 6min (Chan et al., 1998), 14.000 *g* por 4 a 8min (Wall, 2001) e 11.000 *g* por 3min (Lagutina et al., 2004). Entretanto, nas condições aqui descritas, a utilização de 15.000 ou de 18.000 *g* por 5min não foi suficiente para a separação adequada dos lipídeos, que só foi obtida após centrifugação a 15.000 *g* por 15min.

Em oócitos, os cromossomos em metáfase II foram encontrados nas quatro frações obtidas após a centrifugação (Maddox-Hyttel et al., 2004) e, em zigotos, os pronúcleos foram observados na região equatorial, na fração de retículo endoplasmático liso (Tatham et al., 1996). No presente estudo, os pronúcleos encontravam-se com maior frequência na fração da matriz citoplasmática, seguida pela localização na fração de vesículas delimitadas por retículo endoplasmático liso.

Efeito da centrifugação sobre o desenvolvimento embrionário e sobre o potencial de visualização dos pronúcleos

Avaliou-se o efeito da centrifugação em meio que continha citocalasina sobre o desenvolvimento posterior dos embriões e sobre o potencial de visualização dos pronúcleos em todos os zigotos (Tabela 1). A centrifugação em meio com citocalasina não prejudicou ($P > 0,05$) a clivagem (71,2%) e o desenvolvimento até blastocisto (15,1%) em comparação ao grupo não centrifugado (67,7% de clivagem e 17,8% de blastocisto). Isso está de acordo com a descrição de Wall & Hawk (1988), que encontraram taxas de desenvolvimento semelhantes entre zigotos oriundos de FIV não centrifugados e centrifugados após transferência a ovidutos de coelhas. Além disso, não houve efeito da centrifugação sobre o potencial de fecundação e de desenvolvimento embrionário subsequente em oócitos bovinos maturados *in vitro*, centrifugados e submetidos à fecundação *in vitro* ou à ativação artificial com cálcio ionóforo (Chung et al., 2001).

Tabela 1. Proporção de clivagem (entre 46 e 48hpf) e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV), submetidos (centrifugado) ou não (controle) à centrifugação a 15.000 *g* por 15min, entre 14 e 18 hpf, em fluido sintético de oviduto tamponado com HEPES, com 10 µg/mL de citocalasina D.

Tratamento	Clivagem	Desenvolvimento
FIV controle	977/1442 (67,7%)	291/1632 (17,8%)
FIV centrifugado	183/257 (71,2%)	46/304 (15,1%)

Os valores na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

hpf = horas após a fecundação.

HEPES = ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina.

Para a avaliação do potencial de visualização dos pronúcleos, os embriões oriundos de FIV com ou sem pronúcleos visíveis foram separados e destinados ao cultivo. Alguns embriões classificados como sem pronúcleos clivaram e se desenvolveram (Tabela 2), de maneira que não houve diferença ($P > 0,05$) entre a clivagem e o desenvolvimento daqueles com e sem pronúcleos.

Uma vez que alguns embriões classificados como sem pronúcleo clivaram e atingiram o estágio de blastocisto após o cultivo, sugere-se que, dentre esses, além de oócitos não fecundados nos quais não houve formação de pronúcleos, provavelmente havia embriões nos quais os pronúcleos não estavam visíveis, e esses foram aqueles que progrediram no desenvolvimento. Isso demonstra que, mesmo após a

Tabela 2. Proporção de clivagem (entre 46 e 48hpf) e de desenvolvimento até blastocisto (dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV), nos quais foi possível (com PN) ou não (sem PN) a visualização dos pronúcleos, após centrifugação a 15.000 *g* por 15min, entre 24 e 30hpf, em fluido sintético de oviduto tamponado com HEPES, com 10 µg/mL de citocalasina D.

Tratamento	Clivagem	Desenvolvimento
FIV com PN	48/69 (69,6%)	15/69 (21,7%)
FIV sem PN	34/53 (64,1%)	1/17 (5,9%)

Os valores na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

hpf = horas após a fecundação.

HEPES = ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina.

centrifugação, não é possível visualizar os pronúcleos em todos os embriões e, às vezes, nem os dois pronúcleos do mesmo embrião. Esses resultados estão de acordo com evidências de que a visualização só é possível em 60% dos embriões bovinos fecundados *in vitro* e submetidos à centrifugação (Wall, 2001).

A diferenciação entre o pronúcleo masculino e o pronúcleo feminino pelo tamanho (o masculino é maior do que o feminino) não foi possível na maioria dos embriões após centrifugação entre 14 e 18hpf. Em alguns casos, diferenças de tamanho só foram percebidas após a enucleação, por observação do conteúdo removido no interior da pipeta de injeção (Figura 8).

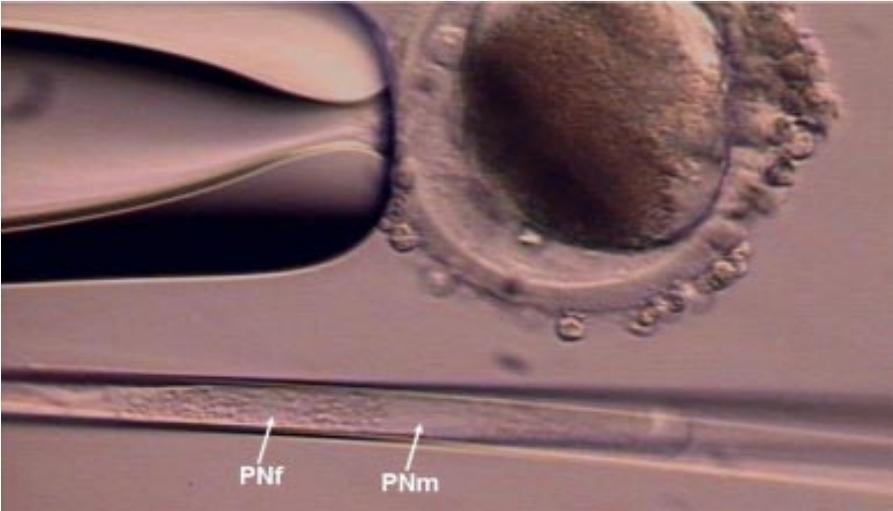


Figura 8. Visualização do pronúcleo feminino (PNf; menor) e do pronúcleo masculino (PNm; maior) no interior da pipeta de injeção após a enucleação de zigoto fecundado *in vitro*.

Apesar de haver relatos de troca de pronúcleos, masculino e feminino, entre zigotos para a obtenção de embriões androgenéticos e ginogenéticos, em bovinos e ovinos (Westhusin & de Azambuja, 1996; Hagemann et al., 1998), neste experimento foram raros os zigotos em que foi possível diferenciar pelo tamanho o pronúcleo masculino do feminino, após centrifugação. Já foi descrito que as diferenças de tamanho dos pronúcleos em zigotos bovinos não são tão evidentes quanto em camundongos (Lagutina et al., 2004). Assim, a diferenciação dos pronúcleos pelo tamanho pode não ser confiável e conduzir a erros, como os descritos após observação (cariotipagem e fenótipo) de zigotos murinos produzidos por transferência pronuclear (McGrath & Solter, 1984a; Okamoto et al., 2000).

Transferência pronuclear

A transferência pronuclear foi realizada no mesmo zigoto, e não entre zigotos diferentes. Essa estratégia foi adotada com o objetivo de isolar o efeito da técnica do efeito do oócito ou do animal, uma vez que em camundongos já foi observado que oócitos de animais diferentes podem apresentar incompatibilidade nucleocitoplásmica (Han et al., 2005). Esse cuidado foi tomado devido ao desconhecimento da origem dos oócitos, que foram obtidos de ovários coletados em abatedouro.

A técnica de transferência pronuclear foi avaliada pelas taxas de sucesso na enucleação e na injeção de pronúcleo (76,6%), de fusão (78,7%) e de lise após a fusão (17,3%). Melhores taxas de fusão, de 85,1% a 90,7%, foram obtidas por Westhusin & de Azambuja (1996). Os resultados de fusão foram superiores à média (22,4%) obtida no Laboratório de Micromanipulação de Embriões da Unesp em Jaboticabal com a reconstituição após a utilização de fibroblasto para a transferência nuclear de célula somática. Isso pode ser devido à quantidade de material transferido para o espaço perivitelínico, visto que o pronúcleo é maior do que o fibroblasto e esse aumento da superfície de contato facilita a aposição entre as membranas e conseqüentemente a fusão.

A lise, observada pela degeneração da membrana citoplasmática, foi influenciada principalmente pela qualidade da pipeta de injeção, pois quanto menor era o

ângulo do bisel, tanto mais suave foi a perfuração da zona pelúcida. Além disso, a lise dependeu da integridade tanto do citoplasma quanto do núcleo gerado, visto que o núcleo lisado provocou lise em citoplasma íntegro após a fusão e vice-versa. Devido ao tamanho do pronúcleo, o diâmetro interno da pipeta de injeção (25 μm) para a transferência pronuclear precisou ser maior do que o comumente utilizado (20 μm) para a transferência nuclear de célula somática, no referido laboratório.

Os embriões-controle da TP-FIV foram produzidos para identificar o efeito da técnica sobre o desenvolvimento após a reconstituição (Figura 9). As taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto da TP-FIV foram comparadas às do grupo controle com pronúcleos visíveis após a centrifugação (Tabela 3). A técnica de transferência pronuclear afetou ($P < 0,05$) as taxas de clivagem e de blastocisto. Westhusin & de Azambuja (1996) não encontraram efeito da técnica de transferência pronuclear sobre o desenvolvimento embrionário em bovinos. Porém, Hagemann et al. (1998) demonstraram diminuição na taxa de blastocisto de 72,1% em embriões oriundos da FIV controle para 50% em embriões oriundos de FIV submetidos à transferência pronuclear.

Tabela 3. Proporção de clivagem (entre 46 e 48hpf) e desenvolvimento até blastocisto (dia 7), em embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV) submetidos (TP-FIV) ou não (FIV controle) à transferência pronuclear.

Tratamento	Clivagem	Blastocisto
FIV controle	48/69 (69,6%) ^a	15/69 (21,7%) ^a
TP-FIV	313/557 (56,2%) ^b	11/505 (2,2%) ^b

^{a, b} Valores com sobrescritos diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

hpf = horas após a fecundação.

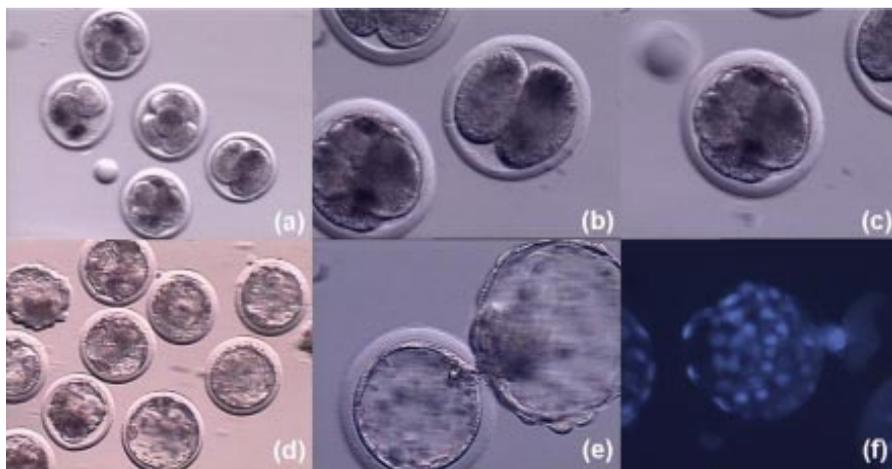


Figura 9. Embriões-controle de transferência pronuclear em zigotos oriundos de fecundação *in vitro*. (a-c) Embriões clivados nos estádios de duas a quatro células; (d) embriões nos estádios de blastocisto inicial, expandido e eclodido; (e) blastocisto em eclosão; (f) blastocisto inicial corado com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em meio de cultura de tecidos 199 por 10min e visualizado sob microscópio de epifluorescência (330 a 385 nm).

Encontrou-se grande dificuldade na produção dos embriões por transferência pronuclear. Em geral, os resultados de FIV apresentaram baixa eficiência nas diversas fases da produção *in vitro* de embriões. A maturação nuclear, avaliada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, que em experimentos prévios apresentava média de 82%, teve média de 61,1% durante os experimentos de transferência pronuclear. Assim, além da micromanipulação, as falhas nas condições de cultivo, cuja possível causa foi a baixa qualidade da água utilizada no preparo dos meios, somente detectada posteriormente, também podem ter comprometido o desenvolvimento dos embriões reconstituídos, apesar do grande número de repetições realizadas por tratamento (7 a 11).

Quando a centrifugação foi realizada entre 14 e 18hpf, houve grande dificuldade na visualização dos pronúcleos, devido ao seu pequeno tamanho antes da singamia, que ocorre com maior frequência às 24hpf (Méo et al., 2007). Por esse motivo, optou-se pela realização da técnica após a singamia, entre 24 e 30hpf, para permitir o aumento do tamanho dos pronúcleos e facilitar sua visualização. Outros autores, que realizaram transferência pronuclear mais precocemente, às 17hpf (Lagutina et al., 2004) e das 18 às 20hpf (Westhusin & de Azambuja, 1996), obtiveram taxas de desenvolvimento melhores do que as apresentadas neste trabalho.

Conclusões

Zigotos bovinos tiveram de ser centrifugados a 15.000 *g* por 15min em meio que continha citocalasina D para que a visualização dos pronúcleos fosse possível. A centrifugação não afetou o desenvolvimento posterior dos embriões, mas também não permitiu a visualização dos pronúcleos em todos os zigotos. Em zigotos bovinos fecundados *in vitro* e submetidos à centrifugação, houve dificuldade técnica para a diferenciação entre o pronúcleo masculino e o pronúcleo feminino pelo tamanho. A técnica de transferência pronuclear em zigotos obtidos por fecundação *in vitro* prejudicou as taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento do trabalho.

Referências bibliográficas

BARTON, S. C.; SURANI, M. A. H.; NORRIS, M. L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**, London, v. 311, n. 5984, p. 374-376, 1984.

CHAN, A. W. S.; HOMAN, E. J.; BALLOU, L. U.; BURNS, J. C.; BREMEL, R. D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 24, p. 14028-14033, 1998.

CHUNG, J. T.; DOWNEY, B. R.; CASPER, R. F.; CHIAN, R. C. Effect of centrifugation on early embryonic development and parthenogenetic activation of bovine oocytes matured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 13, n. 5-6, p. 383-388, 2001.

CRAN, D. G. The distribution of organelles in mammalian oocytes following centrifugation prior to injection of foreign DNA. **Gamete Research**, New York, v. 18, n. 1, p. 67-76, 1987.

HAGEMANN, L. J.; PETERSON, A. J.; WEILERT, L. L.; LEE, R. S. F.; TERVIT, H. R. In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 50, n. 2, p. 154-162, 1998.

HAN, Z.; CHUNG, Y. G.; GAO, S.; LATHAM, K. E. Maternal factors controlling blastomere fragmentation in early mouse embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v. 72, n. 3, p. 612-618, 2005.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; GALLI, C. Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: a comparative study. **Biology of Reproduction**, New York, v. 70, n. 2, p. 400-405, 2004.

LIU, H.; KREY, L. C.; ZHANG, J.; GRITO, J. A. Ooplasmic influence on nuclear function during the metaphase II-interphase transition in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 65, n. 6, p. 1794-1799, 2001.

MADDOX-HYTTEL, P.; HUNTER, R. H.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Ultrastructure and actin distribution after fractionation of bovine oocytes for somatic cell nuclear transfer. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. v. 2, p. 560.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 179-183, 1984a.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygote to support development in vitro. **Science**, Washington, v. 226, n. 4680, p. 1317-1319, 1984b.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Nucleocytoplasmic interactions in the mouse embryo. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 97, p. 277-289 (Suppl.), 1986.

MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. **Genetics**, Austin, v. 145, n. 2, p. 445-451, 1997.

MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; PERECIN, F.; SARAIVA, N. Z.; LEAL, C. L. V.; GARCIA, J. M. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. **Zygote**, v. 15, n. 4, p. 295-306, 2007.

NAGASHIMA, H.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Nuclear transfer of porcine embryos using cryopreserved delipated blastomeres as donor nuclei. **Molecular, Reproduction and Development**, New York, v. 48, n. 3, p. 339-343, 1997.

OKAMOTO, I.; TAN, S.-S.; TAKAGI, N. X-chromosome inactivation in XX androgenetic mouse embryos surviving implantation. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 19, p. 4137-4145, 2000.

PEURA, T. T.; TROUNSON, A. O. Recycling bovine embryos for nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 10, n. 7-8, p. 627-632, 1998.

TATHAM, B. G.; SATHANANTHAN, A. H.; DHARMAWARDENA, V.; MUSESINGHE, D. Y.; LEWIS, I.; TROUNSON, A. O. Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1499-1503, 1996.

WALL, R. J. Pronuclear microinjection. **Cloning and Stem Cells**, Larchmont, v. 3, n. 4, p. 209-220, 2001.

WALL, R. J.; HAWK, H. W. Development of centrifuged cow zygotes cultured in rabbit oviducts. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 673-680, 1988.

WESTHUSIN, M. E.; DE AZAMBUJA, R. M. Development of in vitro derived bovine embryos following pronuclear transplantation and in vitro culture. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 45, n. 1-2, p. 29-35, 1996.