

Comunicação

[Communication]

Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos

[A new technique to count the number of cells of blastocysts]

E.P. Costa¹, F.G. Lopes², E.C.M. Pereira², V.L.D. Queiroz³, G.G. Macedo²,
J.R.M. Almeida Neto², A.H.A. Costa⁴

¹Departamento de Veterinária - UFV

Av. PH Rolfs, s/n

36570-000 – Viçosa, MG

²Aluno de pós-graduação - DVT-UFV – Viçosa, MG

³Aluno de graduação - DVT-UFV – Viçosa, MG

⁴GERMOVET – Viçosa, MG

A contagem do número total de células tem sido utilizada como um importante parâmetro na avaliação da qualidade de embriões. O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células totais do embrião, e o estabelecimento de uma proporção adequada entre massa celular interna e trofoblasto é considerado essencial para assegurar a viabilidade embrionária (Lane e Gardner, 1997).

A escolha do método de coloração depende dos tipos de células e dos objetivos específicos de cada trabalho. O método de coloração de embriões que utiliza o corante DNA específico Hoeschst 33342 foi descrito por Pursel et al. (1985) e Handyside e Hunter (1984) e mais tarde utilizado por Ellington et al. (1990), ao trabalharem com embriões bovinos.

Esse método foi também descrito em outras espécies como em murinos (Warger II et al., 2008) e ovinos (Smith e Wilmot, 1989). Tal técnica envolve a utilização do corante Hoeschst 33342 e a visualização em microscopia de fluorescência após fixação em lâmina e lamínula. Tarin et al. (2002) descreveram o uso de dois corantes, o iodeto de propídeo e o Hoeschst 33342 sucessivamente. Além disso, métodos mais simplificados e de custos reduzidos também têm sido utilizados, como a coloração de Giemsa, descrita em embriões de camundongos (Hishinuma et al., 1996).

Lim et al. (1994) propuseram um método de contagem de células baseado na metodologia utilizada para preparação de cromossomos de zigotos e blastocistos bovinos. Nesse estudo, embriões bovinos foram mantidos em solução de citrato de sódio 0,9% em temperatura de 20 a 25°C, por 15 minutos. Após esse período, os embriões foram mantidos em solução de fixação aceto-álcool por 60 a 90 segundos e transferidos posteriormente para as lâminas. A solução fixadora era composta de metanol, ácido acético e água destilada na proporção 3:2:1, em temperatura de 4°C. Após secagem, durante 30 minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas por 15 a 20 minutos com solução Giemsa 10%. Em seguida, o corante foi removido com água destilada, e as células contadas em microscópio invertido.

O método de contagem de células proposto por Fukui e Ono (1989) consiste na manutenção de embriões em solução de citrato de sódio 0,9% em temperatura ambiente, por 10 a 20 minutos. Após esse tempo, os embriões devem ser mantidos por um minuto em solução de fixação e, então, fixados em lâmina, em depósito de pequeno volume de fixador. A solução fixadora foi composta de álcool, ácido acético e água destilada na proporção 3:2:1, a 4°C. Após a secagem, durante uma hora em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas por 15 minutos com solução Giemsa a 10%.

Recebido em 10 de dezembro de 2009

Aceito em 29 de outubro de 2010

E-mail: epcosta@ufv.br

Posteriormente, o corante foi removido com água destilada, e as células contadas em microscópio de contraste de fase.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica simplificada e eficiente para contagem do número total de células de embriões de camundongas.

O trabalho foi realizado com embriões de camundongas da espécie *Mus musculus*, da linhagem Suíça-Albina. As fêmeas doadoras de embriões foram submetidas ao protocolo de superovulação (Rafferty Jr., 1970) e, posteriormente, colocadas em gaiolas individuais para o acasalamento, na proporção de duas fêmeas para cada macho, por 24 horas.

Após 60 a 80 horas do acasalamento, as fêmeas doadoras foram submetidas à eutanásia para posterior coleta dos embriões. Os procedimentos relacionados ao sacrifício dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, processo 10/2006, em reunião realizada no dia 26 de abril de 2006.

A coleta dos embriões foi precedida da lavagem dos cornos uterinos, por onde se perfundi o meio PBS modificado por Whittingham (1971), previamente equilibrado (37°C), mediante o uso de uma seringa de 3mL acoplada a uma agulha hipodérmica (30 x 0,70mm, 22G). Depois de classificados, foram selecionados para o cultivo apenas embriões nos estádios de blastocisto inicial, mórula compacta graus I e II, que foram posteriormente cultivados durante 10 horas.

Após o término do tempo de cultivo, os embriões, transferidos e lavados em placa escavada, em meio Talp-Hepes modificado, previamente equilibrado (37°C), foram classificados novamente quanto ao estágio de desenvolvimento e à qualidade embrionária (Stringfellow e Seidel, 1998), com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST) em ocular de 10X e objetiva de 4X. Depois de classificados, 195 embriões viáveis no estágio de blastocisto foram processados para contagem do número de células de acordo com a nova técnica proposta.

A fim de se proceder à contagem do número de células, foram executadas sucessivas etapas.

Primeiramente, lâminas previamente preparadas e limpas com solução álcool-éter (1:1) foram riscadas em forma de círculo com uma ponteira de diamante a fim de se delinear o espaço onde se encontrará o embrião durante o procedimento. Após o término do tempo de cultivo, os embriões foram classificados morfológicamente e mantidos em geladeira, aguardando o processamento para próxima etapa. Cada embrião foi submetido separadamente a todos os procedimentos subsequentes. Inicialmente o embrião foi transferido e mantido por 60 segundos em solução de citrato de sódio 0,88% e água destilada, na proporção 1:1, em temperatura ambiente. Após esse tempo, o embrião foi transferido e mantido por 30 segundos em solução de fixação, composta de metanol:ácido acético:água destilada, na proporção 3:2:1, a 5°C. Após esse período, o embrião foi transferido para uma lâmina previamente limpa, desengordurada e enxuta. Depois, com o auxílio de um microscópio estereoscópio em ocular de 10X e objetiva de 4X e uma micropipeta (confeccionada de tubo capilar para micro-hematócrito), foi aspirado todo o excesso de solução de fixação, até que o embrião ficasse levemente aderido na superfície da lâmina. Em seguida, a lâmina foi fixada à temperatura de 37°C, sobre placa aquecedora, por 15 minutos. Após a fixação, a preparação, corada com o *kit* de coloração panótico rápido (Instant Prov®), foi imersa sequencialmente nos corantes números 1, 2 e 3, em intervalos de cinco segundos. Posteriormente, a lâmina foi lavada cuidadosamente em água destilada e seca ao ar. Imediatamente após a secagem, foi adicionada uma pequena gota de óleo de imersão (2µL) na preparação, sendo coberta com uma lamínula (22 x 22mm) e vedada as margens com esmalte. Por fim, foi realizada a contagem do número de células utilizando-se um microscópio estereoscópio em ocular de 10X e objetiva de 4X ou microscópio convencional.

Foram analisadas 195 lâminas confeccionadas pela técnica descrita a partir de embriões murinos previamente expostos a meios de manipulação. A técnica desenvolvida é diferente dos métodos convencionais (Fukui e Ono, 1989; Lim et al., 1994), usualmente empregados para contagem de células embrionárias nas diferentes espécies de animais. A técnica desenvolvida permitiu uma análise rápida e precisa do número total de células embrionárias, aspecto essencial

Nova técnica para contagem...

para estudos de maturação embrionária e fecundação *in vitro*. Além disso, possibilitou visualização nítida de células em microscópio estereoscópio e maior tempo de permanência da qualidade de coloração em lâminas.

O tempo de confecção das lâminas é um fator determinante para o diagnóstico rápido e seguro durante os procedimentos de produção de embriões *in vitro*, principalmente quando se tem um número elevado de lâminas a serem analisadas. O método que utiliza a coloração de Giemsa 10%, descrito por Fukui e Ono (1989), prevê o tempo de uma hora para secagem das lâminas após a fixação, enquanto Lim et al. (1994) preveem 30 minutos. O método proposto descreve a secagem das lâminas em um menor tempo, apenas 15 minutos. Além disso, o tempo de exposição ao corante representa outra vantagem da metodologia proposta. O tempo de permanência do corante Giemsa para coloração de lâminas de embriões foi descrito com duração aproximada de 15 minutos (Fukui e Ono, 1989; Lim et al., 1994), mais longo que o descrito nesta técnica, que é de aproximadamente 15 segundos, sendo de 5 segundos em cada solução.

Outra vantagem da técnica proposta consiste no procedimento de visualização das células embrionárias para a realização da contagem. Enquanto técnicas exigem microscopia de contraste de fase (Fukui e Ono, 1989), microscopia invertida (Lim et al., 1994) ou microscopia de luz (Hishinuma et al., 1996) para a contagem de células, no método proposto este procedimento pode ser realizado com o uso de equipamento mais simples, que é o microscópio

estereoscópio (40x de aumento), o qual permite a visualização e individualização das células (Fig.1) para a realização do procedimento de contagem, tendo em vista que o uso do panótico como corante possibilita boa nitidez na visualização das células embrionárias.

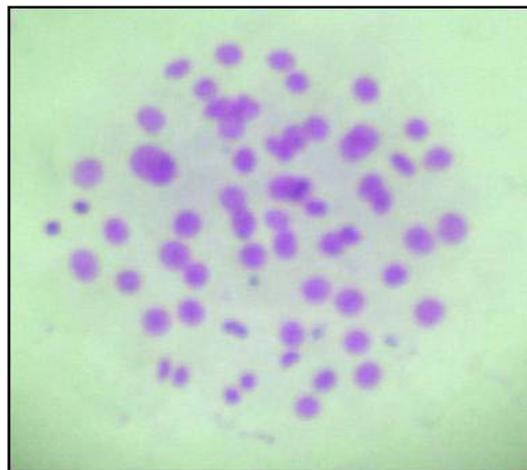


Figura 1. Células de um embrião no estágio inicial de blastocisto expandido e que utilizou a técnica descrita, sob aumento de 400X.

A técnica desenvolvida permitiu o processamento mais rápido de embriões para avaliação do número de células, assim como o uso de microscópios estereoscópios nas análises, e constituiu uma alternativa às técnicas convencionais.

Palavras-chave: contagem de células, embrião, reprodução

ABSTRACT

A simplified, fast, and innovative method was developed to count the total cell number in blastocysts. Murine blastocysts (N = 195) were used in this study. They were obtained after 10h culture of initial blastocysts, compact morulae grades I and II recovered from superovulated mouse. After culture, the blastocysts were selected to test the new proposal of counting. The process was done after embryo fixation in a sodium citrate solution, and adherence in glass slide. Following, the coloration was done using a fast panoptic coloration kit. As a result, it was possible to identify the blastomeres and count them in each blastocyst. This method provided a fast and effective analysis of the total cell number when compared with other techniques. Moreover, this new method shows advantages related to the cell visualization, which can be done in more simple equipment like stereoscopic microscope. Other interesting observed point was the long period of time and quality that the coloration stays on slides, considering other techniques.

Keywords: cell count, embryo, reproduction

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro; à CAPES, pela concessão da bolsa de estudo; e à Germovet, por ceder equipamentos e material para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ELLINGTON, J.E.; CARNEY, E.W.; FARRELL, P.B. et al. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, v.43, p.97-104, 1990.
- FUKUI, Y.; ONO, H. Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.86, p.501-506, 1989.
- HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. A rapid procedure for visualizing the inner cell mass and trophoctoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *J. Exp. Zool.*, v.231, p.429-434, 1984.
- HISHINUMA, M.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Post-implantation development of demi-embryos induction of decidual cell reaction in mice. *Theriogenology*, v.45, p.1187-1200, 1996.
- LANE, M.; GARDNER, D.K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. *J. Assisted Reprod. Gen.*, v.14, p.398-403, 1997.
- LIM, J.M.; OKITSU, O.; OKUDA, K. et al. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, v.41, p.1091-1098, 1994.
- PURSEL, V.G.; WALL, R.J.; REXROAD, C.E. et al. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, v.24, p.687-691, 1985.
- RAFFERTY Jr., K.A. *Methods in experimental embryology of the mouse*. Baltimore: John Hopkins University, 1970. 82p.
- SMITH, L.C.; WILMUT, I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, v.40, p.1027-1035, 1989.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds). *Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários*. Illinois: Savoy, 1998. 180p.
- TARIN, J.J.; GOMEZ-PIQUER, V.; PEREZ-ALBALA, S. et al. Predictive variables of in vitro fertilization and pre-implantation embryo development in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.*, v.63, p.38-46, 2002.
- WARGER II, W.C.; NEWMARK, J.A.; WARNER, C.M. et al. Phase-subtraction cell-counting method for live mouse embryos beyond the eighth-cell stage. *J. Biom. Optics*, v.13, p.0340051-0340058, 2008.
- WHITTINGHAN, P.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v.233, p.125-126, 1971.