

EQUIPAMENTO SIMPLES PARA A MICROMANIPULAÇÃO DE EMBRIÕES

SIMPLE EQUIPMENT FOR EGG MICROMANIPULATION

A. P. Novaes¹, C. I. Biscegli², M. Bugner¹,
A. J. Tambasco¹, A. E. D. Feliciano Silva¹.

¹Unidade de Execução de Pesquisas de Âmbito Estadual de São Carlos, EMBRAPA, Cx. P. 339 - 13.560 - São Carlos - SP.

²Unidade de Apoio à Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária, EMBRAPA, Cx. P. 741, 13.560 - São Carlos - SP.

Recebido para publicação em 16 de janeiro de 1.990

ABSTRACT

A simple equipment for egg micromanipulation is described. It allows precise and vibrationless movement in X, Y and Z directions. Movements are done through a hydraulic systems which were made using inexpensive materials as plastic or glass hypodermic syringe.

Mouse embryos were bisected without further difficulties.

INTRODUÇÃO

Na história da genética animal, HEAPE (3), trabalhando com coelhos, realizou a primeira transferência de embriões em mamíferos. A partir daí, foram necessárias seis décadas para se obter o primeiro bovino oriundo da transferência de embrião, o que ocorreu em 1951 (HEYMAN & VINCENT, 4).

A partir desses fatos, coube a diversos pesquisadores complementarem a história, como NIBART & BOUYSSOU (10), que realizaram a transferência de embriões de vacas superovuladas, BRACKETT (1) e SUGARAWA ET AL (13), autores das primeiras fecundações "in vitro", WILLADSEN (15) e OZIL (11), que desenvolveram as primeiras técnicas de microcirurgia em embriões. A sexagem através do estudo do cariótipo foi obtida por POPESCU & CRIBIU (12) e por KING (5). A in-

produção de genes em embriões foi idealizada por GORDON (2) e a produção de clones foi iniciada por TARKOWSKI (14), seguido por MOORE & ROWSON (9) e MODLINSKY (8) e a produção de quimeras realizadas por LU & MARKERT (7).

Com o desenvolvimento dessas técnicas, paralelamente foram criados instrumentos, que culminaram com os modernos micromanipuladores, pipetas de fixação de embriões, pipetas de transferência de células embrionárias, microaspiradores e etc., de tal forma que hoje vemos micromanipuladores equipados com sensíveis motores de passo, manipulação hidráulica e outros sistemas, que atendem à precisão e suavidade dos movimentos, quando realizados sob grandes aumentos.

A micromanipulação de embriões exige esses aparelhos sofisticados para que possa ser realizada. Este fato implica na importação de micromanipuladores, o que restringe seu uso em pesquisa nas instituições e onera as firmas que trabalham com transferência de embriões - cujo objetivo é a produção animal - ficando os produtores, que são os maiores interessados nessas técnicas, à mercê dos altos custos.

O objetivo deste trabalho, realizado pela Unidade de Apoio à Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária (UAPDIA) e a Unidade de Execução de Pesquisas de Âmbito Estadual (UEPAE) de São Carlos, foi desenvolver um micromanipulador simples, de baixo custo, feito com material encontrado no mercado, de forma a minimizar os custos dessa aparelhagem e torná-la mais acessível.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para se obterem os movimentos do manipulador no plano horizontal, nos eixos X e Y, construiu-se uma base circular de alumínio, medindo 70 mm de diâmetro por 10 mm de altura. Uma haste de alumínio, medindo \varnothing 10 mm X 220 mm e rosqueada à base, serve para fixar, na altura desejada, o conjunto que contém uma seringa hipodérmica de 10ml, a qual tem preso, à base do êmbolo, o conjunto da haste manipuladora. A haste é articulada na base e no meio, mede 140 mm, e na extremidade são colocados suportes para a fixação da lâmina de corte ou da micropipeta.

Para movimentar o êmbolo da seringa que irá permitir os movimentos no plano vertical (eixo Z), esta é conectada

tada, por manguito de plástico, a uma seringa hipodérmica de plástico de 3 ml, que movimentará o conjunto, preenchido com óleo ou água. A seringa de 3 ml tem o seu êmbolo lubrificado com graxa de silicone e movimentado por sistemas de rosca de 18 e 36 fios por polegada, que permite os movimentos macro e micro (Fig. 1).

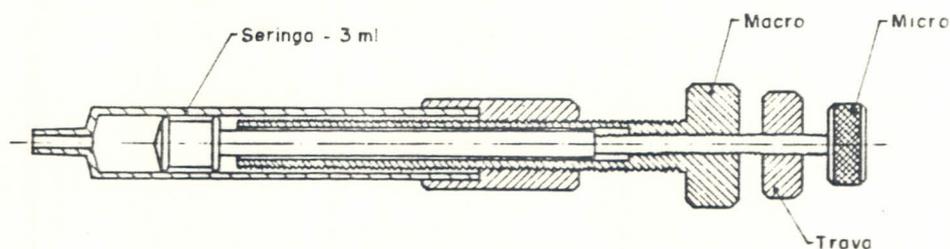


Fig. 1 - Seringa com o comando macro e micro.

Dois conjuntos manipuladores são fixados à mesa de manipulação, feita em vidro de 5 mm, medindo 300mm x 510 mm. As bases de alumínio dos manipuladores são untadas com graxa de silicone grossa e aderem perfeitamente ao vidro, permitindo os movimentos do conjunto no plano horizontal, nos eixos X, Y e suas variáveis (Fig. 2).

O conjunto da seringa de 3 ml é fixado em base metálica, fora da mesa manipuladora, para não transferir vibrações a esta.

O sistema de aspiração para as micropipetas consiste de seringa de plástico de 3 ml, com êmbolo lubrificado com graxa de silicone e movimentado por sistema de rosca de 44 fios por polegada. Esta seringa é conectada a micropipeta por manguito plástico e fixada à base destinada às outras seringas.

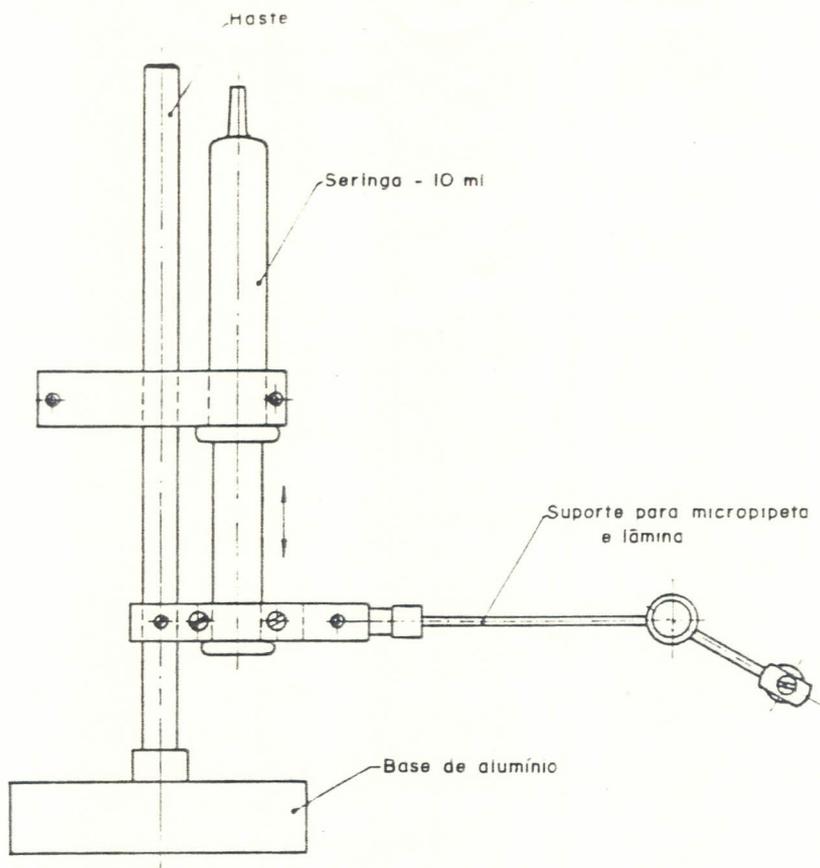
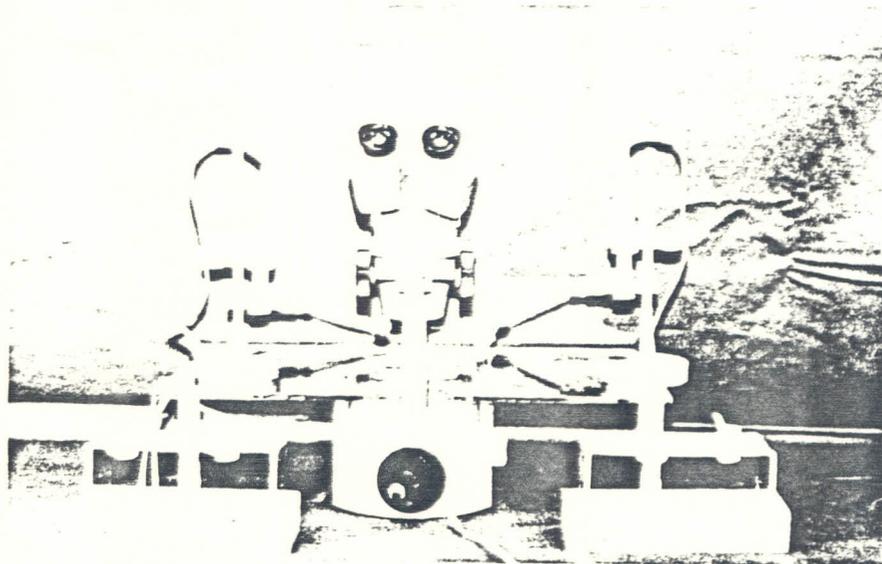


Fig. 2 - Esquema do micromanipulador.

Os testes de aplicabilidade deste aparelho foram realizados com embriões de camundongas, medindo aproximadamente 80 micras. Consistiu da verificação da suavidade de movimentos sob lupa, fixação dos embriões nas micropipetas, deslocamento para posicionamento de corte e bipartição dos mesmos. O conjunto pode ser visualizado na foto:



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os manipuladores fixados à mesa de vidro, com suas bases untadas com graxa de silicone grossa, devido à perfeita aderência das superfícies não permitem a movimentação brusca do conjunto. Com isto, os movimentos, tanto da micropipeta como da lâmina de corte no plano horizontal, quando observados sob a lupa, mostram-se suaves.

O movimento executado no plano vertical pelo êmbolo da seringa de 10 ml, comandado pelo sistema hidráulico através da seringa de 3 ml - que tem seus movimentos reduzidos pelo sistema de parafusos com roscas grossas e finas - permite posicionar a haste com a micropipeta ou com a lâmina, controlando-se a altura desejada de forma delicada, o que é desejável, quando feito sob grandes aumentos, que tendem a exacerbar esses movimentos, Lin (6).

A conjugação dos movimentos no plano horizontal X e Y possibilita posicionar os manipuladores em diversos ângulos, obtendo-se com isto a facilidade da movimentação da pipeta que, conjugada com a manipulação do eixo vertical, permite fixar o embrião em sua extremidade.

O sistema de aspiração com seringa de 3 ml. comandado por parafusos de rosca fina, confere à pipeta a propriedade de aspirar e fixar o embrião à sua extremidade, sem ferir a membrana pelúcida, o que é indispensável para o êxito da manipulação.

Todos esses mecanismos, que têm como objetivo a fixação do embrião, permitiram que a lâmina de corte acoplada ao manipulador fizesse a bipartição dos mesmos, possibilitando concluir que o sistema pode atender às necessidades contidas na micromanipulação de embriões.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mauricio Melo de Alencar pelo apoio e incentivo, aos técnicos da UAPDIA pela colaboração, à bibliotecária Vera Lucia Campos Octaviano, pela normalização das referências bibliográficas e à Suzete Ap. Braz do Carmo pela diagramação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRACKETT, B. D. (1983). A review of bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 19:1-15.
2. GORDON, J. (1983). Transgenic mice : a new and powerful experimental tool in mammalian developmental genetics. *Devel. Gen.*, 4:1-20.
3. HEAPE, W. (1891). Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. R. Soc. London*, 48:457.
4. HEYMAN, Y. & VINCENT, C. (1988). Transplantation: les embryons qui viennent du froid. *Biofutur*, (juin): 38-42.
5. KING, W. A. (1984). Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21:7-17.
6. LIN, T. P. (1971). Egg micromanipulation. In: DANIEL JR, J. C. *Methods in mammalian embryology*. Colorado, W. H. Freeman. p. 157-71.