

TROCA DE CARIOPLASTO ENTRE ZIGOTOS ATIVADOS COM ESTRÔNCIO OU 6-DMAP

Méo, S.C.^{1,2}; Ferreira, C.R.³; Perecin, F.²; Saraiva, N.Z.²; Tetzner, T.A.D.²; Borges, J.C.²; Yamazaki, W.²; Leal, C.L.V.³; Meirelles, F.V.³; Garcia, J.M.²

¹Embrapa Pecuária Sudeste-CPPSE, São Carlos, SP, Brasil; ²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; ³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-USP, Pirassununga, SP, Brasil.

simone@cnpse.embrapa.br

A ativação oocitária constitui importante etapa dos procedimentos de transferência nuclear e injeção espermática intracitoplasmática. Dessa maneira, torna-se necessária a busca por tratamentos de ativação eficientes e que promovam o efeito mais semelhante possível ao desencadeado pelo espermatozóide. Neste trabalho, avaliamos o efeito da troca de carióplasto entre zigotos produzidos por dois tratamentos de ativação diferentes sobre o desenvolvimento embrionário inicial. Para tanto, oócitos bovinos foram maturados *in vitro* por 24h em TCM 199 com 10% de SFB, 1µg/mL de FSH, 50µg/mL de hCG e 1µg/mL de estradiol, desnudados com hialuronidase (0,5% por 5min) e ativados com ionomicina (5µM por 5min) seguida de estrôncio (20mM SrCl₂ e 10µg/mL de citocalasina D, por 6h; tratamento S) ou 6-DMAP (2mM por 4h; tratamento D). Após 16 a 24h, os zigotos foram centrifugados (15.000xg por 15min), avaliados quanto à presença de pronúcleo e submetidos à transferência de carióplasto (TC): remoção de carióplasto de um zigoto e transferência para outro zigoto previamente enucleado, em microscópio invertido com micromanipuladores. A TC realizada no mesmo zigoto produziu os grupos controle TC-S e TC-D, enquanto a TC entre tratamentos produziu embriões com citoplasma estrôncio e núcleo 6-DMAP (CSND) e citoplasma 6-DMAP e núcleo estrôncio (CDNS). Os embriões reconstituídos por 2 pulsos elétricos de 1,5kV/cm por 30µseg foram co-cultivados com células da granulosa em SOF com 2,5% de SFB e 3mg/mL de BSA, avaliados quanto às taxas de clivagem (46 a 48h) e desenvolvimento até oito-células (Dia 4) e blastocisto (Dia 7) e analisados pelo teste de Qui-quadrado. Os procedimentos de cultivo foram realizados em gotas de 100µL cobertas por óleo mineral a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar, e os meios foram suplementados com 0,2mM de piruvato e 83,5µg/mL de amicacina. A clivagem foi semelhante ($p>0,05$) entre os tratamentos TC-S (73,6%), TC-D (73,3%), CSND (76,5%) e CDNS (69,5%). Em relação às taxas de oito-células, TC-S (60%) foi similar ($p>0,05$) a TC-D (68,4%) e CSND (36,4%); enquanto CSND foi inferior ($p<0,05$) a TC-D; e CDNS (25%) foi inferior ($p<0,05$) a todos os grupos. A taxa de blastocisto em TC-D (31,7%) foi superior ($p<0,05$) a TC-S (7,3%), CSND (6,8%) e CDNS (4,9%). Observamos que o grupo CDNS comportou-se de maneira semelhante ao grupo TC-S. Entretanto, contrário a nossas expectativas, o grupo CSND foi inferior a TC-D, sugerindo efeito negativo do citoplasma estrôncio sobre o carióplasto 6-DMAP, assim como do carióplasto estrôncio sobre o citoplasma 6-DMAP. Além disso, enquanto nos tratamentos TC-S e TC-D a queda nas taxas de desenvolvimento só foi significativa ($p<0,05$) do estágio de oito-células até blastocisto, nos grupos CSND e CDNS as taxas caíram ($p<0,05$) tanto de duas- até oito-células quanto até blastocisto. Esse aumento do bloqueio no estágio de oito-células pode refletir as diferenças existentes entre os tratamentos estrôncio e 6-DMAP, que poderiam levar à incompatibilidade núcleo-citoplasmática. Acreditamos que esse efeito prejudicial do estrôncio seja mediado por sua ação no citoplasma, no entanto, novos estudos serão necessários para a confirmação dessa hipótese e para a identificação dos fatores citoplasmáticos responsáveis por esse efeito. Apoio Financeiro: FAPESP.

KARYOPLAST EXCHANGE BETWEEN ZYGOTES ACTIVATED WITH STRONTIUM OR 6-DMAP

Oocyte activation is an important step for procedures involving embryo and gamete micromanipulation, such as nuclear transfer and intracytoplasmic sperm injection. Thus, there is a great interest in searching for more efficient activation treatments whose effects are as similar as possible to those provoked by spermatozoon. In this work, we evaluated early embryonic development after karyoplast exchange between zygotes activated using two different treatments. For this purpose, bovine oocytes were *in vitro* matured for 24h in TCM 199 with 10% FCS, 1µg/mL FSH, 50µg/mL hCG, and 1µg/mL estradiol. Afterwards, they were denuded in hyaluronidase (0.5% for 5min) and submitted to activation with ionomycin (5µM for 5min) followed by strontium (20mM SrCl₂ and 10µg/mL cytochalasin D, for 6h; S treatment), or by 6-DMAP (2mM for 4h; D treatment). After 16 to 24h, centrifuged (15.000xg for 15min) zygotes were assessed for pronuclear development and then designated to karyoplast transfer (KT). KT, which consisted in removing karyoplast from one zygote and transfer to another previously enucleated zygote, was performed under an inverted microscope with micromanipulators. Using the same zygote, KT was employed to produce control embryos: KT-S and KT-D groups. When using zygotes activated by the two different treatments, KT produced embryos with strontium cytoplasm and 6-DMAP nucleus (SCDN), and 6-DMAP cytoplasm and strontium nucleus (DCSN). The embryos reconstructed by two 1.5kV/cm electric pulses for 30µs were co-cultured with granulosa cells in SOF with 2.5% FCS and 3mg/mL BSA. Rates of cleavage (46 to 48h) and development to the eight-cell (Day 4) and blastocyst (Day 7) stages were evaluated by Chi-square. Culture conditions during all experimentation were in 100µL droplets under mineral oil at 38.5°C, 5% CO₂ in air and maximum humidity. Culture media were supplemented with 0.2mM pyruvate and 83.5µg/mL amicacin. Cleavage rates were similar ($p>0,05$) among treatments KT-S (73.6%), KT-D (73.3%), SCDN (76.5%), and DCSN (69.5%). Regarding to eight-cell development rates, KT-S (60%) was similar ($p>0,05$) to KT-D (68.4%) and SCDN (36.4%); while SCDN was inferior ($p<0,05$) to KT-D; and DCSN (25%) was inferior ($p<0,05$) to all groups. Blastocyst development rate in KT-D (31.7%) was superior ($p<0,05$) to KT-S (7.3%), SCDN (6.8%), and DCSN (4.9%). We observed that DCSN embryos were more similar to KT-S ones. However, against to our expectation, the strontium cytoplasm and 6-DMAP nucleus (SCDN) embryos were inferior to KT-D, suggesting a negative effect of strontium cytoplasm on 6-DMAP karyoplast, as well as of strontium karyoplast on 6-DMAP cytoplasm. Besides, while in treatments KT-S and KT-D there was just a significant ($p<0,05$) decrease in development rates from eight-cell to the blastocyst stage, in SCDN and DCSN the rates decreased ($p<0,05$) from two- to eight-cell and then to blastocyst stage. This higher developmental arrest up to eight-cell stage may suggest that the differences between strontium and 6-DMAP activation treatments can lead to nucleus-cytoplasm incompatibilities. We suppose that the detrimental effect of strontium is mediated by its action in cytoplasm, however, future studies are necessary to confirm this hypothesis and to identify the cytoplasmic factors involved in this event.