

Protocolo de fluorescência de oócitos e embriões bovinos com PKH67 e DAPI



Bruna Cristina Heinzen^[a], João Filipi Scheffer Pereira^[b], Letícia Fracaro^[c], Jonathan Jesus da Silva^[d], Fernando Jean Dijkstra^[e], Norton Lee Bruel^[a], Cristina Santos Sotomaior^[b]

^[a] Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

^[b] Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

^[c] Núcleo de Tecnologia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

^[d] Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

^[e] Curso de Graduação em Biotecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

* Endereço para correspondência: joao.filipi@gmail.com

Resumo

Na produção *in vitro* de embriões (PIVE) a fluorescência é uma importante ferramenta na determinação de estágios de divisão celular de gametas e embriões. Colorações de membrana com o PKH67 não são rotineiramente empregadas nesses tipos celulares, diferentemente do DAPI, uma coloração de núcleos eficientemente utilizada nas pesquisas. O objetivo desta descrição de técnica é relatar a eficiente aplicação da associação de PKH67 e DAPI na coloração de oócitos e embriões. Este protocolo foi adaptado a partir do protocolo de fluorescência celular do Laboratório Experimental de Cultivo Celular – PUCPR. A primeira etapa é a coloração de membrana das estruturas (oócitos e embriões), que ocorreu quando expostas a uma solução de 2 µL/mL de PKH67 (Sigma Aldrich) em gota de 60 µL depositadas em placas petry de 60mm por 10', que em seguida foram transferidas para gota de 100 µL de solução composta por 10 µL/mL de SFB em PBS. A segunda etapa consiste na coloração de núcleos. As estruturas foram transferidas da solução SFB/PBS para o permeabilizante de membrana celular TBS-Triton 1x em gota de 100 µL por 5' e posteriormente depositadas em gota de 60 µL de DAPI na concentração de 1 µL/mL por 10'. Todo o processo ocorreu em placa aquecida a 37 °C e a manipulação foi realizada com o auxílio de micropipetador e esteromicroscópio em luz mínima. As lâminas foram montadas depositando as estruturas em gota de 10 µL de glicerol (SIGMA), sob lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência LEICA DM4000 e as imagens capturadas pelo LAS AF foram avaliados pela metodologia um total de 44 oócitos, 35 zigotos e 134 embriões nos estágios de blastocisto e blastocisto expandido. Quando associados, PKH67 permitiu identificar a delimitação de membra celular e DAPI possibilitou a identificação de diferentes estágios de condensação da cromatina em

oócitos, os dois corpúsculos polares e a contagem total de blastômeros e células de embriões *in vitro* com os núcleos corados na limitação de membrana promovida pelo PKH67.

Palavras-chave: PIVE. PKH67. DAPI.