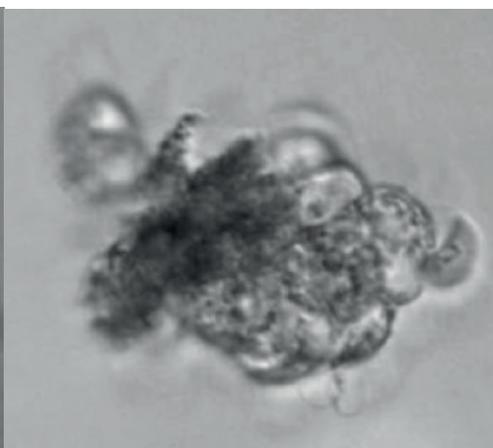
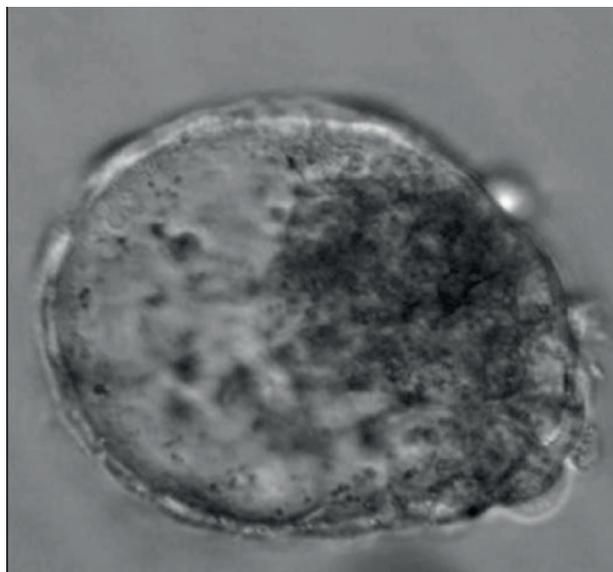


Foto: Luiz Sérgio de Almeida Camargo



COMUNICADO  
TÉCNICO

90

Juiz de Fora, MG  
Setembro, 2018

**Embrapa**

## Biopsia Embrionária Manual

### Handmade Embryo Biopsy

Luiz Sergio de Almeida Camargo  
Carolina Capobiango Romano Quintão  
Célio de Freitas  
Clara Slade de Oliveira

# Biopsia Embrionária Manual

## Handmade Embryo Biopsy<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Luiz Sergio de Almeida Camargo, Médico veterinário, D.Sc. em Ciência Animal, pesquisador, Embrapa Gado de Leite

Carolina Capobiango Romano Quintão, Farmácia e Bioquímica, M.Sc. analista, Embrapa Gado de Leite

Célio de Freitas, Médico veterinário, M.Sc. em reprodução animal, analista, Embrapa Gado de Leite

Clara Slade de Oliveira, Médica veterinária, D.SC. em reprodução animal, analista, Embrapa Gado de Leite

## Introdução

A seleção genômica é uma ferramenta capaz de contribuir para o aumento do ganho genético nas características de importância econômica, permitindo a seleção precoce de animais, quando comparada aos métodos tradicionais de melhoramento. A seleção genômica é utilizada para identificação de touros de genética superior e para prever o potencial produtivo de animais jovens em países como os EUA, o Canadá e Holanda. Contudo, vários animais submetidos a esse processo seletivo podem não possuir o potencial produtivo desejado pelos proprietários e, nesse caso, são descartados. Esses animais representam perdas para a propriedade, refletidas no custo de manutenção de receptoras com gestação de bezerras de baixo potencial genético-genômico e, também, pelo menor valor do animal na venda. Um modo de se evitar essas perdas é realizar a seleção genômica

antes da gestação, isto é, nos embriões, o que chamamos de seleção genômica embrionária (SGE). Com essa seleção, é possível identificar qual embrião tem maior potencial produtivo evitando-se a gestação de embriões de baixo potencial produtivo, de modo que o proprietário pode se dedicar somente às receptoras com gestações de fetos com potencial genético superior, estimados por meio da análise do genoma. Como o Brasil é o maior produtor mundial de embriões por métodos de fertilização *in vitro* e possui uma extensa rede de laboratórios comerciais, a SGE pode ser facilmente aplicada. Este documento mostra um protocolo otimizado para biópsia manual, sem auxílio de micromanipuladores, em embriões fertilizados *in vitro* em estágio de blastocisto. Com a utilização deste protocolo obteve-se taxa de gestação e de nascimentos semelhantes à de embriões não biopsiados, demonstrando a viabilidade da biópsia embrionária em nossas condições experimentais e

a possibilidade de sua aplicação em um sistema comercial, sugerindo seu uso para genotipagem objetivando a SGE.

## Protocolo

### Materiais

- Blastocistos fertilizados *in vitro* (D7 após fertilização) (Figura 1);
- Meio tamponado sem soro;
- Meio de cultivo tamponado, para lavagem embrionária (pode ser enriquecido com albumina sérica ou soro);
- Óleo mineral testado para embriões;
- Meio de cultivo ou de transporte embrionário;
- Microlâmina “*ultrashort splitting*” (*Bioniche Animal Health*);
- Placas de Petri 10 e 100 mm diâmetro estéreis;
- Álcool 70 GL;
- Criotubos ou tubos tipo Eppendorf para conservação da amostra;
- Pipetas de 5, 10, 100 e 1.000  $\mu\text{L}$ ;
- Ponteiros estéreis para pipetas de 5, 10, 100 e 1.000  $\mu\text{L}$ ;
- Placa aquecedora,

- Estereoscópio;
- Palhetas de 0,25 mL para envase de embriões.

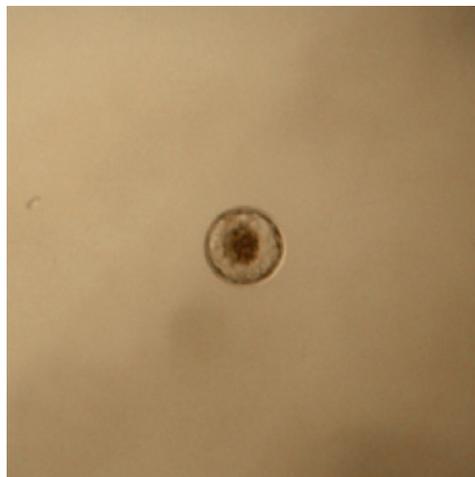


Foto: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**Figura 1.** Blastocisto expandido no dia sete (7) pós-fertilização selecionado para biópsia.

## Procedimento

- Remover os embriões fertilizados *in vitro* em estágio de blastocisto ou blastocisto expandido e lavá-los em meio tamponado aquecido à 35-37 °C;
- Fazer microgotas de 20-30  $\mu\text{L}$  de meio tamponado sem soro, em uma placa de 100 mm mantendo-a em placa aquecedora;
- Identificar as gotas (enumere-as). Será colocado um embrião por microgota;
- Cobrir as microgotas com óleo mineral (Figura 2);



Foto: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**Figura 2.** Microgotas em placas de petri de 100 mm cobertas com óleo mineral.

- Lavar os blastocistos 1-2x em meio tamponado sem soro e depois distribuí-los, individualmente, nas microgotas. Anotar o número da gota e do embrião em uma planilha;
- Com auxílio de estereoscópio, identificar e avaliar a qualidade morfológica de cada embrião, e anotar -a junto com o número da microgota e do embrião (Figura 3);
- Posicionar o embrião no meio da gota usando uma pipeta com ponteira de 10 $\mu$ L ou com TomCat;
- Usar a microlâmina para cortar o embrião na posição da blastocele;
- Faça pequenos movimentos na placa para certificar de que o mesmo possui alguma aderência ao fundo da placa, para evitar movimento brusco do embrião durante o corte;
- Se necessário, faça um risco no fundo da placa com a microlâmina e

posicione o embrião por cima deste corte para facilitar a aderência;



Foto: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**Figura 3.** Uso de estereoscópio para identificar e avaliar os embriões nas microgotas.

- Posicione primeiramente a ponta da microlâmina acima da posição do embrião e só então abaixe a base da mesma, cortando o embrião. Com auxílio do estereoscópio em aumento entre 15 e 25x, a lâmina deve passar pela blastocele, evitando a massa celular interna (deve estar na extremidade maior do embrião cortado, que será a porção transferida) (Figura 2);
- Se necessário, mova o embrião com a base da microlâmina antes de fazer o corte para visualizar a blastocele e a massa celular interna;
- Ao aproximar a base da microlâmina do embrião, faça o movimento

- de corte, como se estivesse riscando a base da placa de petri;
- Após cortar parte da blastocele (15-25% do embrião), procure separar as duas partes movendo-as com a própria microlâmina, com cuidado para o material biopsiado não aderir na lâmina (Figura 4);

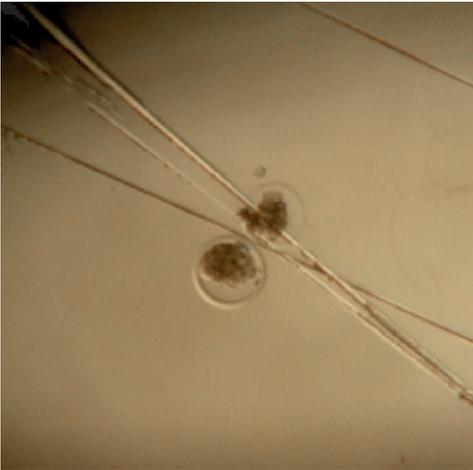


Foto: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**Figura 4.** Blastocisto após corte com microlâmina. Observe os riscos no fundo da placa feitos com a microlâmina.

- Transferir o embrião biopsiado para meio de cultivo tamponado para que se recupere por 3-5h;
  - Após esse tempo, avaliar os diferentes graus de re-expansão da blastocele (pouca re-expansão, média re-expansão ou re-expansão completa) (Figura 5);
  - Separar os embriões re-expandidos (independente do grau) daqueles sem re-expansão. Descartar os embriões não re-expandidos;
  - Lavar os embriões re-expandidos em meio de transferência embrionária;
  - Envasar o embrião biopsiado em palhetas apropriadas (0,25 mL) e proceder a transferência à fresco.
- Coletar o material biopsiado em volume de 1  $\mu\text{L}$  com ajuda de pipeta com ponteira de 1-10  $\mu\text{L}$  e transferir para criotubo (armazenamento em nitrogênio líquido) ou tubo tipo Eppendorf (armazenamento em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Não armazene Eppendorfs em nitrogênio líquido. Tampe e congele para posterior envio para genotipagem. Anote no tubo a data e o número do embrião (idêntico ao da planilha);

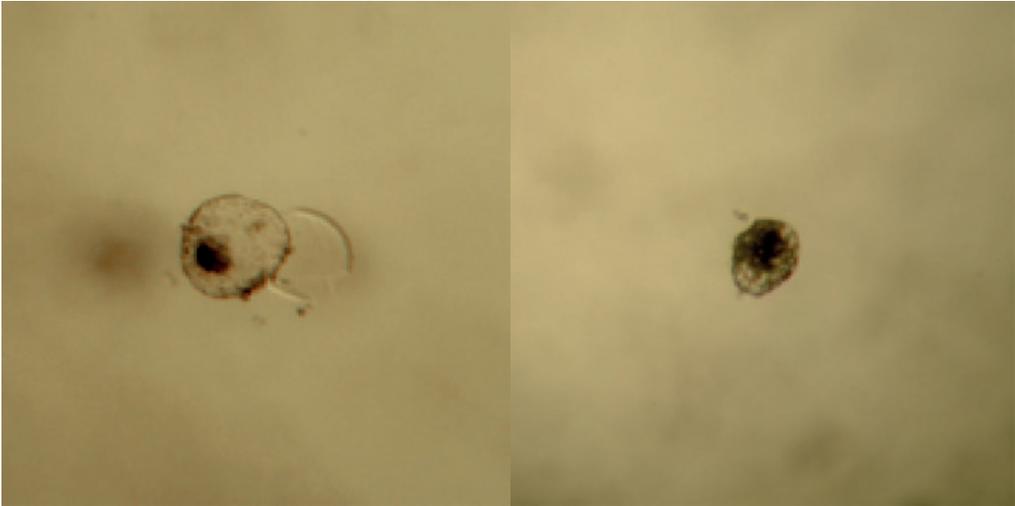


Foto: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**Figura 5.** Blastocistos após período de cultivo para re-expansão. Imagem à esquerda: blastocisto com re-expansão completa; imagem à direita: blastocistos com re-expansão média.

## Comentários

- Execute as atividades em placa aquecida entre 35-37 °C;
  - Quando executar biópsias em vários embriões, pode escolher realizar as biópsias primeiro e depois coletar as amostras, mas isso pode dificultar a coleta do material devido ao aumento da aderência das células;
  - Não leve muito tempo para executar o corte para a obtenção da biópsia, caso contrário os embriões podem se aderir a microlâmina e dificultar o corte;
  - Ao usar a mesma microlâmina para diversas biópsias em sequência,
- entre cada procedimento de biópsia enxague a microlâmina em álcool 70 °GL por 2x (se necessário, use uma gase estéril para limpar as laterais da microlâmina) e, em seguida, enxague por 3x em meio tamponado sem soro e aquecido;
- Como alternativa à transferência dos embriões no mesmo dia da biópsia, pode-se permitir que os embriões se recuperem por 24h, após o procedimento de biópsia, em meio de cultivo equilibrado, sob condições atmosféricas (5% CO<sub>2</sub> em ar ou 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>) e de temperatura de cultivo (38,5 C). Isso pode ser feito em incubadora de bancada ou em transportadora de embriões. Nesse caso, a

separação dos embriões re-expandidos poderá ser feita após 24h da biópsia, antes do envase;

- Como terceira alternativa, após o breve período de recuperação (3-5h) e a separação dos embriões, pode-se promover o envase dos embriões em palhetas com meio embrionário em condições atmosféricas (5% CO<sub>2</sub> em ar ou 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>) e de temperatura de cultivo (38,5 C) adequadas e

transportá-los em transportadora de embriões com controle de temperatura por 24h.

## Referência

OLIVEIRA, C. S.; QUINTÃO, C. C. R.; FREITAS, C. de; CAMARGO, A. J. dos R.; SERAPIÃO, R. V.; CAMARGO, L. S. de A. Post implantation development reveals that biopsy procedure can segregate healthy from unhealthy bovine embryos and prevent miscarriages. **Animal Reproduction Science**, v. 184, p. 51-58, 2017.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Leite**

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco  
CEP: 36038-330 – Juiz de Fora/MG  
Telefone: (32)3311-7400  
Fax: (32)3311-7424  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição  
On Line (2018)



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Pedro Braga Arcuri*

Secretário-Executivo

*Inês Maria Rodrigues*

Membros

*Jackson Silva e Oliveira, Leônidas Paixão Passos,  
Alexander Machado Auad, Fernando Cesár Ferraz Lopes,  
Francisco José da Silva Léo, Pérsio Sandir D'Oliveira,  
Fábio Homero Diniz, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Nivea  
Maria Vicentini, Letícia Caldas Mendonça, Rita de Cássia  
Bastos de Souza, Rita de Cássia Palmyra da Costa Pinto,  
Virginia de Souza Columbiano Barbosa*

Supervisão editorial

*Carolina Capobianco Romano Quintão*

Normalização bibliográfica

*Inês Maria Rodrigues*

Tratamento das ilustrações e editoração

*Carlos Alberto Medeiros de Moura*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Foto da capa

*Luiz Sérgio de Almeida Camargo*