



Quantificação do DNA e genotipagem de biópsias de embriões bovinos Gir e Girolando produzidos *in vitro*

[DNA quantification and genotyping of biopsies obtained from Gyr and Girolando *in vitro* produced bovine embryos]

J.M.C.L. Martins^{1,2}, L.S.A. Camargo³, M.V.B. Silva³, M.A. Machado³,
D.R.L. Reis³, C.C.R. Quintão³, L.A.G. Nogueira⁴, C.S. Oliveira²

¹Aluna de pós-graduação - Universidade Federal Fluminense - Niterói, RJ

²Embrapa Gado de Leite - Valença, RJ

³Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, MG

⁴Universidade Federal Fluminense - Niterói, RJ

RESUMO

A biópsia embrionária associada à genotipagem permite a obtenção de informações genômicas antes mesmo da transferência dos embriões. Neste estudo, foram avaliadas amostras biopsiadas de blastocistos bovinos transferidos para receptoras (n=47), sob a hipótese de que a raça (Gir ou Girolando), o estágio embrionário (blastocisto ou blastocisto expandido) e a competência para estabelecimento de prenhez (positiva ou negativa) afetariam a quantidade e a qualidade do DNA da amostra obtida. O DNA foi extraído, amplificado, quantificado por eletroferograma e genotipado. O parâmetro *call rate* (CR) foi adotado para mensurar a qualidade da genotipagem. Obteve-se concentração de DNA de 86,07±171,66ng/μL e CR 0,73±0,17. O CR não variou em função da quantidade de DNA nas amostras. As variáveis raça e estágio embrionário não influenciaram a concentração de DNA, nem o CR. Houve efeito da prenhez sobre o CR (P=0,0187), mas, como houve maior CR nas amostras provenientes do grupo prenhez negativa, não foi possível associar esse parâmetro à qualidade embrionária. Concluiu-se que a raça e a qualidade embrionária não afetam os parâmetros aqui estudados em amostras embrionárias, ou seja, embriões com maiores chances de implantação não refletem alta qualidade nas amostras de biópsia genotipadas.

Palavras-chave: biópsia embrionária, seleção genômica, produção *in vitro* de embriões, Gir, Girolando

ABSTRACT

Embryo biopsy associated with genotyping allows genomic information before embryo transfer. In this study, blastocyst biopsy samples from embryos transferred to recipients (n= 47) were evaluated, under the hypothesis that breed (Gyr or Girolando), embryonic stage (blastocyst or expanded blastocyst) and competence to establish pregnancy (positive or negative) would affect the quantity and DNA quality of samples. DNA was extracted, amplified, quantified by electropherogram and genotyped. The parameter call rate (CR) was used to measure the quality of genotyping. DNA concentration of 86.07±171.66ng/μL, and CR 0.73±0.17 was obtained. CR did not vary according to the amount of DNA in the samples. The variables breed and embryonic stage had no influence on DNA concentration or CR. There was pregnancy effect on the CR (P= 0.0187), but since there was a higher CR in the samples from the negative pregnancy group, it was not possible to associate this parameter with the embryonic quality. We conclude that the breed and embryo quality do not affect the evaluated parameters in embryonic samples. Embryos with higher chances of implantation do not reflect high quality in embryo biopsy genotyped samples.

Keywords: embryo biopsy, genomic selection, *in vitro* embryo production, Gyr, girolando

Recebido em 6 de março de 2018

Aceito em 27 de março de 2019

E-mail: juliamclmartins@gmail.com

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de bovinos leiteiros passou por profundas transformações nas últimas décadas. A era genômica trouxe diversas possibilidades às raças leiteiras, intensificando o melhoramento dos rebanhos pela redução do intervalo de geração e pela avaliação de muitos genes de interesse zootécnico (Boison *et al.*, 2017). Por meio dessa abordagem, painéis comerciais foram criados para facilitar o serviço de genotipagem, de forma a mapear um grande número de polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) de interesse zootécnico (Wiggans *et al.*, 2017). A estimativa do valor genômico de animais com base nessas análises (*genomic breeding value*, GEBV) permite seleção guiada com alta acurácia pela significância biológica dos marcadores, e essa estratégia já está consolidada para seleção de touros jovens (Bouquet e Juga, 2013).

Desde os primeiros esforços para o melhoramento guiado por marcadores genéticos, os embriões foram explorados. A seleção de embriões é possível graças a uma importante ferramenta acessória à sua produção, que consiste na biópsia embrionária (Alonso *et al.*, 2003). Por meio da biópsia, realizada pela remoção de algumas células embrionárias, é possível obter-se amostra para análises moleculares. Inicialmente, as amostras de biópsia eram utilizadas para detecção de alguns poucos genes, incluindo marcadores para seleção do sexo dos embriões (Thibier e Nibart, 1995).

Hoje, as técnicas evoluíram, de forma a possibilitar a obtenção do genoma de embriões e a avaliação de inúmeros marcadores. Isso ocorreu pela elaboração de técnicas de amplificação global do genoma, que possibilitam obter-se material suficiente para genotipar a amostra embrionária (Polissení *et al.*, 2010) e, com auxílio da imputação genômica, inferir com acurácia o genoma do animal que nascerá daquele embrião (Le Bourhis *et al.*, 2012). Dessa forma, as biotécnicas da reprodução são importantes ferramentas para serem associadas às análises genômicas, em especial no caso da produção *in vitro* no Brasil. Por suas vantagens, a PIVE apresenta crescimento constante no Brasil, com mais de 376.000 embriões produzidos em 2015 e crescente adoção em sistemas leiteiros

(Viana *et al.*, 2017). A biópsia de blastocistos é segura e possibilita índices semelhantes aos de embriões não biopsiados na implantação e no nascimento de animais (Schoolcraft e Katz-Jaffe, 2013 e Oliveira *et al.*, 2017).

No cenário nacional, porém, a biópsia embrionária seguida de genotipagem ainda não está sendo utilizada comercialmente, sobretudo pela falta de protocolos e plataformas especializadas no país. Painéis com informações de dezenas de milhares de SNP foram desenvolvidos para uso na seleção genômica em bovinos e poderão ser aplicados na seleção embrionária. Nesse cenário, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade e a adequação de amostras biopsiadas de embriões bovinos para genotipagem pelo painel 50K. Foram comparadas amostras embrionárias de raças (Gir ou Girolando), estádios (blastocisto ou blastocisto expandido) e competências (prenhez negativa ou positiva) distintas, para averiguação se essas características afetariam a quantidade e a qualidade das amostras de DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental: a presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Ceua/EGL, protocolo 29/2013). Embriões Gir leiteiro (n=17) e embriões Girolando F1 (n=30) produzidos *in vitro* foram submetidos ao procedimento de micromanipulação embrionária, seguido de cultivo por três horas para avaliação da reexpansão. O material obtido na biópsia foi armazenado em nitrogênio líquido, por um período de aproximadamente 12 meses, até que fosse realizada a extração, a quantificação e a genotipagem do DNA. Os procedimentos de produção, biópsia e transferência de embriões estão descritos brevemente abaixo e com detalhes em Oliveira *et al.* (2017).

Micromanipulação embrionária: a biópsia embrionária foi realizada no sétimo dia de desenvolvimento após a fertilização *in vitro*. Os embriões se encontravam nos estágios de blastocisto – BL (n=21) e blastocisto expandido – BX (n=26). Apenas embriões grau 1 foram utilizados. O procedimento foi realizado por microsecção, com o auxílio de uma microlâmina operada manualmente (Ultra-Sharp Splitting Blade, Bioniche, CAN, ou

micromanipulator blade, The Microscope Company[®], USA). Após o procedimento, os embriões foram cultivados em meio HSOF, de três a seis horas, para avaliação da reexpansão. Embriões reexpandidos foram transferidos para receptoras Girolando, com estro sincronizado por protocolo hormonal à base de progesterona. A taxa de gestação foi avaliada por exame ultrassonográfico, através da via transretal, 30 dias após a fertilização *in vitro*. Apenas embriões transferidos para receptoras foram avaliados neste estudo.

Extração e amplificação do DNA: as amostras foram submetidas à extração e à amplificação de DNA utilizando-se o *kit* Illustra[™] Single Cell GenomiPhi DNA Amplification (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), conforme as recomendações do fabricante. Quantificação do DNA: a integridade e a quantidade do material amplificado foram verificadas pelo eletroesferograma gerado pelo equipamento 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. O procedimento é realizado pela da técnica de eletroforese microfluídica, por meio da qual as amostras individuais são analisadas e uma imagem do gel é gerada, dimensionando e quantificando os resultados. A concentração total de DNA (ng/μL) foi o principal parâmetro observado, a fim de se avaliar a quantidade de material genômico presente em cada amostra.

Genotipagem do DNA: as amostras foram genotipadas para a caracterização do perfil de SNPs em painel Bovine SNP50k (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), conforme a especificação do fabricante. Como forma de medida de qualidade dos dados obtidos por meio da análise, a principal variável observada foi o CR. Os resultados das amostras foram comparados entre as raças (Gir e Girolando), o estágio embrionário (blastocisto e blastocisto expandido) e a competência pós-transferência (prenhez negativa e positiva).

Análise estatística: a concentração de DNA média foi comparada entre os grupos com CR \geq 80% e CR $<$ 80%, utilizando-se o teste T de *Student*, no programa Excel. Os dados de efeito de raça, estágio e prenhez foram analisados utilizando-se o comando GLM do SAS. A resposta *call rate* sofreu transformação – raiz quadrada de arcosseno –, e a resposta

concentração de DNA foi transformada em log. Foi analisada a interação fatorial tripla, com grupos estabelecidos pós-tratamento, e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey-Kramer. O nível de significância utilizado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, amostras de biópsias embrionárias de blastocistos bovinos foram processadas e caracterizadas com relação à raça, ao estágio e à competência embrionária (inferida pelo resultado de prenhez). Primeiramente, as amostras foram quantificadas pelo Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), e o volume final obtido foi o mesmo para todas as amostras, correspondendo a 20μL. A concentração obtida de DNA das amostras de biópsia (n=47) variou de 2,03ng/μL a 726,03ng/μL, com média de 86,07±171,66ng/μL (Fig. 1A). Os resultados apresentaram alta variabilidade entre as amostras (coeficiente de variação=40,19), e isso também foi evidenciado no estudo de Davies *et al.* (2016). A microsecção é uma técnica manual, que pode ocasionar a produção de biópsias embrionárias de tamanhos distintos, com número de células e concentrações de DNA distintos.

O *Call Rate* (CR) é um parâmetro obtido na genotipagem, que avalia a qualidade dos genótipos de acordo com o número de SNPs identificados adequadamente. Essa taxa é calculada a partir da divisão do número de SNPs identificados pelo número total de SNPs presentes no *chip* de genotipagem utilizado. O valor obtido representa o CR, indicando, em porcentagem, a taxa de determinação de genótipos para uma determinada amostra. Os resultados do CR também apresentaram alta variabilidade (coeficiente de variação=18,52), com amplitude de 0,28 a 0,97 e média 0,73±0,17 (Fig. 1B). De todas as amostras embrionárias, 55% apresentaram CR abaixo de 0,8. Segundo Le Bourhis *et al.* (2012), amostras embrionárias analisadas com imputação de dados dos pais apresentam confiabilidade elevada quando o CR está acima de 0,8.

A variação do CR não ocorreu em função da quantidade de DNA das amostras. Isso pôde ser observado quando se separaram os dados em grupos de CR alto e baixo. A comparação

realizada entre eles sugere que amostras com maiores CR têm, em média, menores concentrações de DNA (Fig. 1C).

Posteriormente, foi avaliado se o CR e a concentração total de DNA se relacionavam com a raça, com o estágio de desenvolvimento embrionário e com a prenhez. A prenhez, nesse caso, foi considerada uma medida de qualidade embrionária, que estima a competência do embrião em produzir uma gestação. Não houve interação significativa entre os fatores raça, estágio embrionário e prenhez considerando-se as respostas CR ($P=0,9671$) e a concentração de

DNA ($P=0,5183$). Os fatores foram considerados características independentes e são apresentados individualmente. A raça do embrião não influenciou significativamente as medidas CR e a concentração de DNA, sugerindo que a qualidade dos genótipos e sua quantificação independem da composição racial dos embriões (Fig. 2A e 2B). O estágio de desenvolvimento embrionário também não afetou as medidas CR (Fig. 3A) e a concentração de DNA (Fig. 3B). A qualidade dos genótipos e a quantidade de DNA são, portanto, similares em blastocistos e blastocistos expandidos.

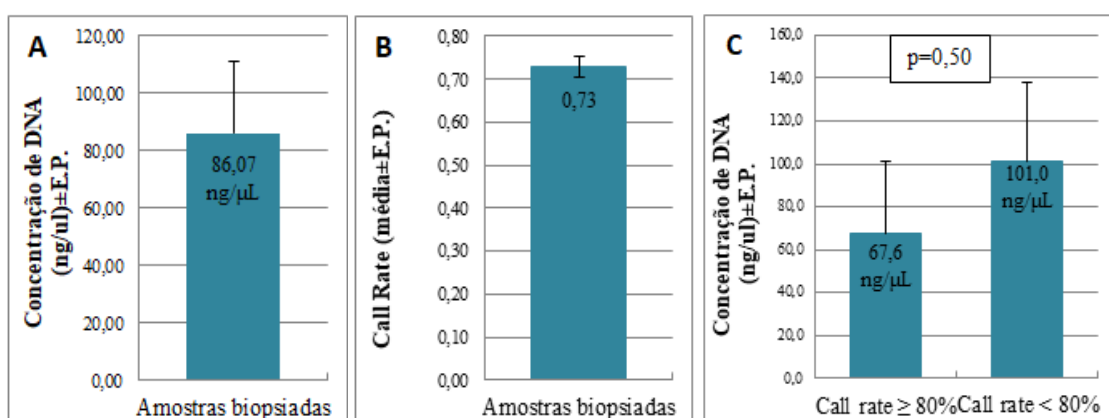


Figura 1. Parâmetros das amostras biopsiadas de embriões bovinos produzidos *in vitro* após quantificação e genotipagem do DNA. A: média da concentração total de DNA das amostras. B: média CR das amostras. C: concentração de DNA considerando o CR dos grupos $\geq 80\%$ e $< 80\%$. Gráficos indicam médias e erro-padrão.

Carbonneau *et al.* (1997) demonstraram que os embriões biopsiados no sétimo dia de desenvolvimento, por meio da técnica de microsecção, assim como no presente trabalho, apresentaram maiores taxas de gestação que aqueles biopsiados no quinto dia, por meio da técnica de microaspiração. Neste estudo, 14 prenhez foram provenientes de embriões biopsiados no estágio de blastocisto expandido (66,7%), e sete (33,3%) no estágio de blastocisto. Em artigo anterior deste grupo (Oliveira *et al.*, 2017), demonstrou-se maior resistência ao procedimento de biópsia quando embriões são biopsiados em estágio de desenvolvimento mais avançado, conforme também descreveram Alonso *et al.* (2003).

Após a transferência do embrião para o útero de receptoras, ocorre a eclosão e se inicia o processo de alongamento do trofoblasto, que cresce mais de 200 vezes (Assis Neto *et al.*, 2010), e esse processo é crítico para o estabelecimento da gestação (revisado por Wiltbank *et al.*, 2016). Embriões mais avançados possuem também maior número de células, especialmente do trofocitoderma. Essa característica pode indicar que, nesses embriões com mais células, a recuperação ao procedimento (reexpansão) e a implantação são favorecidas quando há um número maior de células do trofocitoderma, que são responsáveis pela placentação e são as células coletadas no procedimento de biópsia.

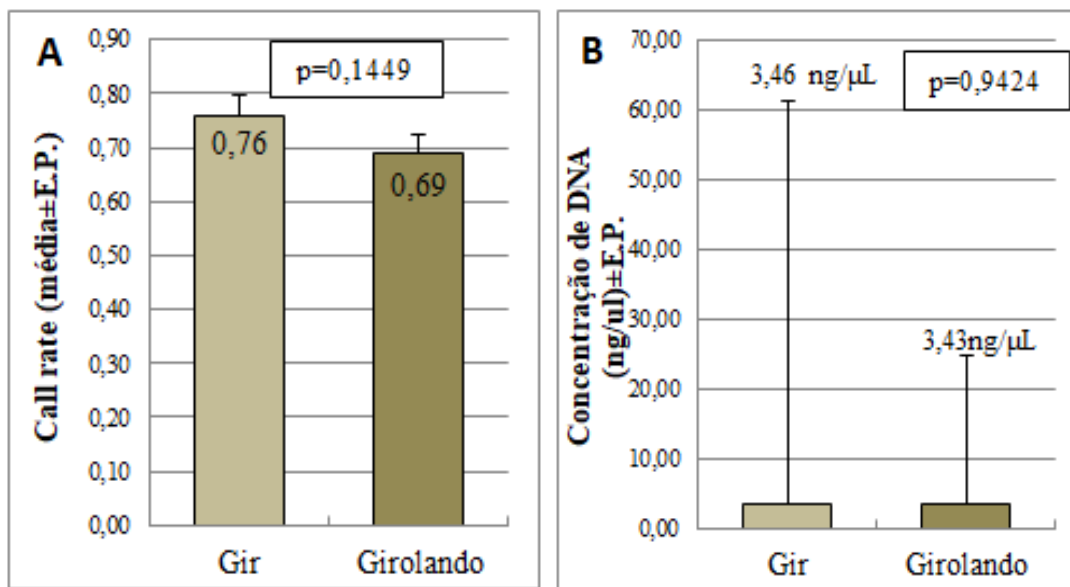


Figura 2. Caracterização do efeito raça nas amostras biopsiadas de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A: média CR das amostras biopsiadas em função das raças Gir e Girolando. B: média da concentração de DNA das amostras biopsiadas em função das raças Gir e Girolando. Gráficos indicam taxas médias e erro-padrão.

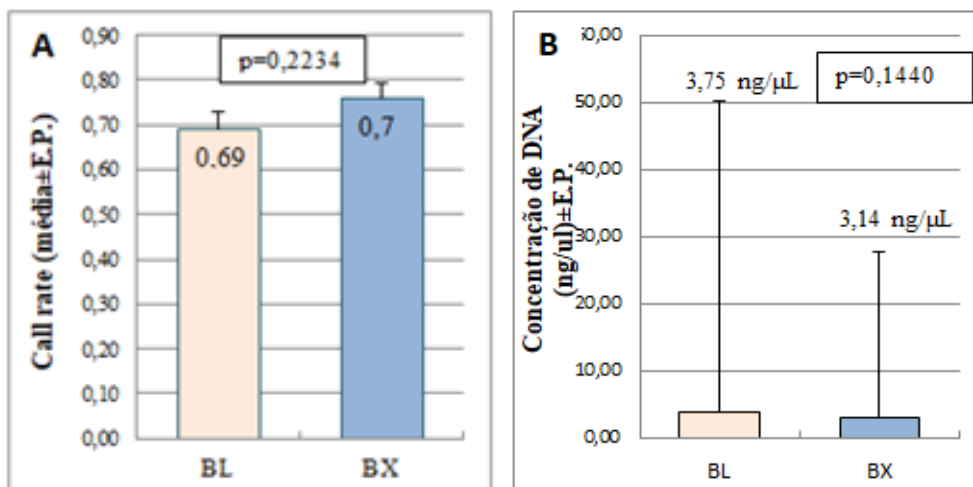


Figura 3. Caracterização do efeito estágio de desenvolvimento embrionário nas amostras biopsiadas de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A: média do CR das amostras biopsiadas em função do efeito estágio de desenvolvimento blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX). B: média da concentração de DNA das amostras biopsiadas em função do efeito estágio de desenvolvimento blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX). Gráficos indicam taxas médias e erro-padrão.

Dos embriões transferidos (n=47), 21 resultaram em prenhez positiva e nascimento dos animais (taxa de prenhez de 45%). Esse resultado reforça que o procedimento de biópsia não interfere na viabilidade embrionária, conforme constatado também por Chrenck *et al.* (2001) e Oliveira *et al.* (2017), sugerindo que a suposta agressão

realizada pelo procedimento foi segura para o embrião. Além disso, embriões que sobrevivem ao procedimento podem ser mais resistentes, caso a biópsia promova a “seleção” de embriões saudáveis, como sugerido por Oliveira *et al.* (2017). A competência embrionária, avaliada pela presença ou não de prenhez, afetou os

resultados do CR ($P=0,0143$) (Fig. 4A), indicando que algumas amostras embrionárias, apesar de terem apresentado alta qualidade na genotipagem, não evoluíram para uma gestação. Isso impossibilitou uma associação entre os resultados da genotipagem com o

estabelecimento de gestações. Em relação aos resultados da concentração de DNA, a competência embrionária não a influenciou, e os grupos prenhez positiva e prenhez negativa apresentaram resultados similares (Fig. 4 B).

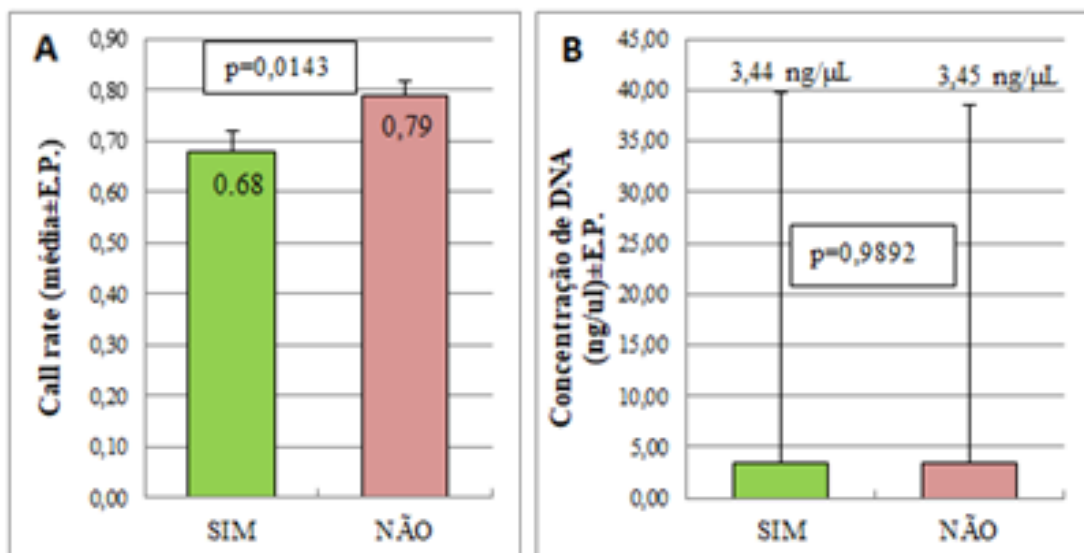


Figura 4. Caracterização do efeito competência embrionária pós-transferência nas amostras biopsiadas de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A: média do CR das amostras biopsiadas em função do efeito prenhez positiva (SIM) e prenhez negativa (NÃO). B: média da concentração de DNA das amostras biopsiadas em função do efeito prenhez positiva (SIM) e prenhez negativa (NÃO). Gráficos indicam taxas médias e erro-padrão.

A interpretação dos resultados referentes à concentração de DNA é complexa devido à amplificação realizada antes da quantificação do material genômico. É esperado que ocorra a amplificação de todas as amostras de forma padronizada e completa, mas esse processo pode causar erros e introduzir viés nos grupos. No entanto, esse procedimento é necessário em razão de a quantidade limitada de gDNA obtida na biópsia embrionária ser restritiva para a aplicação de testes moleculares, o que evidencia a necessidade de o material ser amplificado (Spits *et al.*, 2006 e Le Bourhis *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

Não há interferência da raça (Gir ou Girolando) e do estágio embrionário (blastocisto ou blastocisto expandido) na qualidade da amostra embrionária para genotipagem. Além disso, a

alta qualidade das amostras, indicada pelo $CR \geq 80\%$, não está relacionada com maiores taxas de implantação e prenhez. O procedimento de biópsia permite a obtenção de material genômico embrionário, sem comprometer a viabilidade pós-implantacional dos embriões, e, associado à técnica de amplificação, pode ser utilizado com sucesso para análises genômicas em aproximadamente 45% das amostras processadas, conforme a abordagem descrita.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Gado de Leite (SEG: 03.13.05.004.00.02.000), à Faperj (CÓD: 210.719/2014) e à Capes, pelo apoio financeiro. Os autores agradecem a Alonso, R.V., pela assistência técnica no processamento das amostras.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, R.V.; WEPPERT, M.; GARCIA, J.F.; REICHENBACH, H.D. Effect of biopsy by piezo-micromanipulation on developmental capacity of in vitro produced bovine morula and blastocysts. *Acta Sci. Vet.*, v.3, p.215, 2003.
- ASSIS NETO, A.C.; PEREIRA, F.T.; SANTOS, T.C. *et al.* Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.*, v.45, p.760-772, 2010.
- BOISON, S.A.; UTSUNOMIYA, A.T.H.; SANTOS, D.J.A. *et al.* Accuracy of genomic predictions in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.100, p.5479-5490, 2017.
- BOUQUET, A.; JUGA, J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. *Animal*, v.7, p.705-713, 2013.
- CARBONNEAU, G.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D. Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology*, v.47, p.266, 1997.
- CHRENCK, P.; BOULANGER, L.; HEYMAN, Y. *et al.* Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology*, v.55, p.1071-1081, 2001.
- DAVIES, J.; DENYER, T.; HADFIELD, J. Bioanalyzer chips can be used interchangeably for many analyses of DNA or RNA. *Biotechniques*, v.60, p.197-199, 2016.
- LE BOURHIS, D.; AMIGUES, Y.; CHARREAUX, F. *et al.* Embryo genotyping from in vivo biopsied bovine embryos after whole genome amplification. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.22, p.192, 2009.
- LE BOURHIS, D.; MULLAART, E.; SCHROOTEN, C. *et al.* Breeding values concordance between embryos and corresponding calves. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.24, p.180, 2012.
- OLIVEIRA, C.S.; QUINTÃO, C.C.R.; FREITAS, C.C. *et al.* Post implantation development reveals that biopsy procedure can segregate “healthy” from “unhealthy” bovine embryos and prevent miscarriages. *Anim. Reprod. Sci.*, v.184, p.51-58, 2017.
- POLISSENI, J.M.S.; SÁ, W.F.; GUERRA, M.O. *et al.* Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.*, v.93, p.783-788, 2010.
- SCHOOLCRAFT, W.B.; KATZ-JAFFE, M.G. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil. Steril.*, v.100, p.615-619, 2013.
- SPITS, C.; LE CAIGNEC, C.; DE RYCKE, M. *et al.* Optimization and evaluation of single-cell whole genome multiple displacement amplification. *Hum. Mutat.*, v.27, p.496-503, 2006.
- THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, v.43, p.71-80, 1995.
- VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 31., 2017, Cabo de Santo Agostinho. *Proceedings...* Cabo de Santo Agostinho, PE: SBTE, 2017.
- WIGGANS, G.R.; COLE, J.B.; HUBBARD, S.M.; SONSTEGARD, T.S. Genomic selection in dairy cattle: the USDA experience. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.5, p.309-327, 2017.
- WILTBANK, M.C.; BAEZ, G.M.; GARCIA-GUERRA, A. *et al.* Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.86, p.239-253, 2016.