

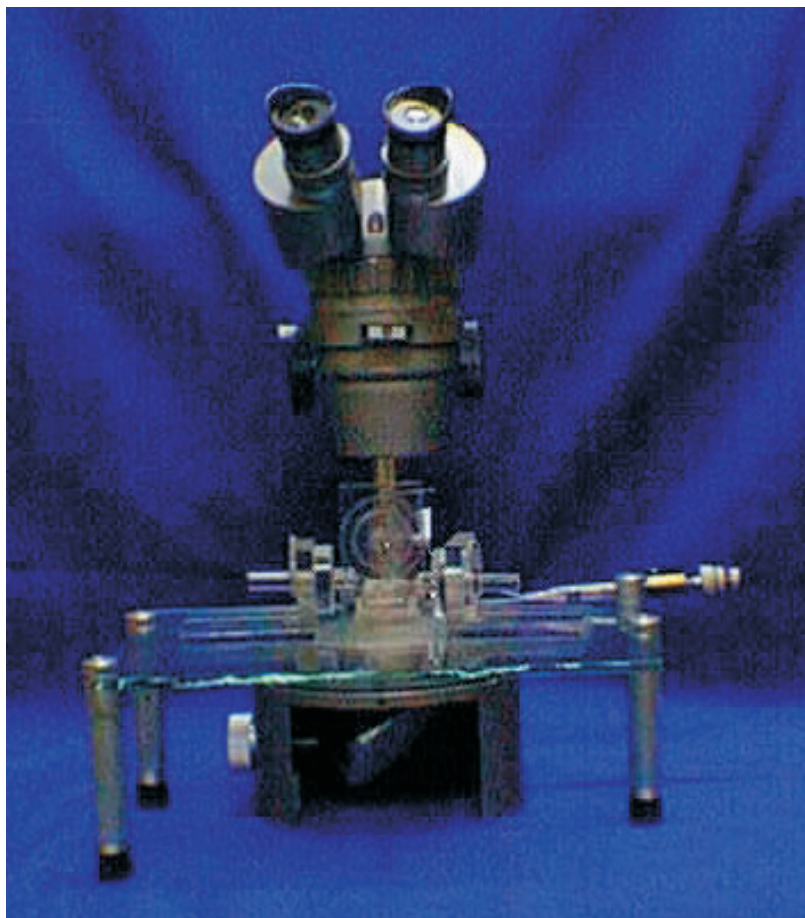
**CIRCULAR TÉCNICA**

ISSN 1413-9545  
outubro, 1997

Número 6/97

**NOVO SISTEMA DE MICROMANIPULAÇÃO**

Antonio Pereira de Novaes  
Clovis Isberto Biscegli



**Embrapa**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

## NOVO SISTEMA DE MICROMANIPULAÇÃO

Antonio Pereira de Novaes<sup>1</sup>  
Clovis Isberto Biscegli<sup>2</sup>

### INTRODUÇÃO

Conta uma lenda que um árabe, usando o artifício de impregnar com algodão a secreção de uma égua no cio, ao se aproximar do melhor garanhão de uma tribo rival, conseguiu excitá-lo e colher o ejaculado. Esse foi levado e introduzido na genitália da égua em cio. Houve a fecundação e, com o nascimento de um belíssimo potro, aconteceu a primeira inseminação artificial.

Coube ao monge Lazzaro Spallanzani, em 1780, realizar com o sêmen coletado de um cão a inseminação de uma cadela. Esse fato foi repetido um ano mais tarde por Pietro Rossi.

Elias Ivanov demonstrou que era possível substituir o líquido seminal por um soro artificial e que o frio ajudava a conservar o sêmen. Em 1914, Giuseppe Amantea construiu a primeira vagina artificial para coleta de sêmen e na Rússia, em 1938, mais de cinquenta milhões de ovelhas foram inseminadas (Mies Filho, 1978).

Na história genética animal, Heape (1891), trabalhando com coelhos, realizou a primeira transferência de embriões em mamíferos. Desde então, foram necessárias seis décadas para se obter o primeiro bovino oriundo da transferência de embriões, o que ocorreu em 1951 (Heyman & Vincent, 1988).

A partir desses fatos, coube a diversos pesquisadores complementar a história, como Nibart & Bouyssou (1981), que realizaram a transferência de embriões de vacas superovuladas, Brackett (1983) e Sugarawa (1984), autores das primeiras

---

<sup>1</sup> MSc. pesquisador Embrapa Pecuária Sudeste

<sup>2</sup> Dr. pesquisador Embrapa Instrumentação Agropecuária

fecundações *in vitro*, Willadsen (1981) e Ozil (1983), que desenvolveram as primeiras técnicas de microcirurgia em embriões. A sexagem por meio do estudo do cariótipo foi obtida por Popescu & Cribiu (1982) e por King (1984). A introdução de genes em embriões foi idealizada por Gordon (1983) e a produção de clones foi iniciada por Tarkowski (1959), seguido por Moore et al. (1968) e Modlinski (1970). A produção de quimeras foi realizada por Lu & Markert (1980).

Com o desenvolvimento dessas técnicas, paralelamente foram criados instrumentos que culminaram com os modernos micromanipuladores, micropipetas para fixação de embriões, micropipetas para transferência de células embrionárias e microaspiradores, entre outros, de tal forma que hoje existem micromanipuladores equipados com sensíveis motores de passo, com mecanismo hidráulico (Novaes et al., 1990; Biscegli et al., 1990) ou com sistemas mecânicos, que atendem à precisão e suavidade dos movimentos, normalmente realizados sob lupa e a grandes aumentos.

A micromanipulação de embriões ou de insetos, como, por exemplo, na inseminação de abelhas (Souza, 1981), exige aparelhos sofisticados. Esse fato, por vezes, implica na importação de equipamentos, que em virtude do elevado custo, restringe o seu uso inclusive na pesquisa. Constata-se que os produtores são os principais prejudicados, devido ao atraso na pesquisa, que envolve o uso de micromanipuladores.

O objetivo deste trabalho, realizado pelo CNPDIA e CPPSE, foi desenvolver um sistema completo de micromanipulação, que inclui o micromanipulador, um esticador, um cortador de micropipeta e uma microforja para acabamento das micropipetas, como recomenda Lin (1971). Todo o sistema foi construído a partir de materiais disponíveis no mercado, de forma a reduzir o custo, tornando o produto final acessível inclusive aos pequenos produtores.

## DESCRIÇÃO DO SISTEMA

### Micromanipulador:

O micromanipulador desenvolvido é constituído das seguintes partes: uma cantoneira confeccionada em acrílico, conforme ilustra a figura 1a.

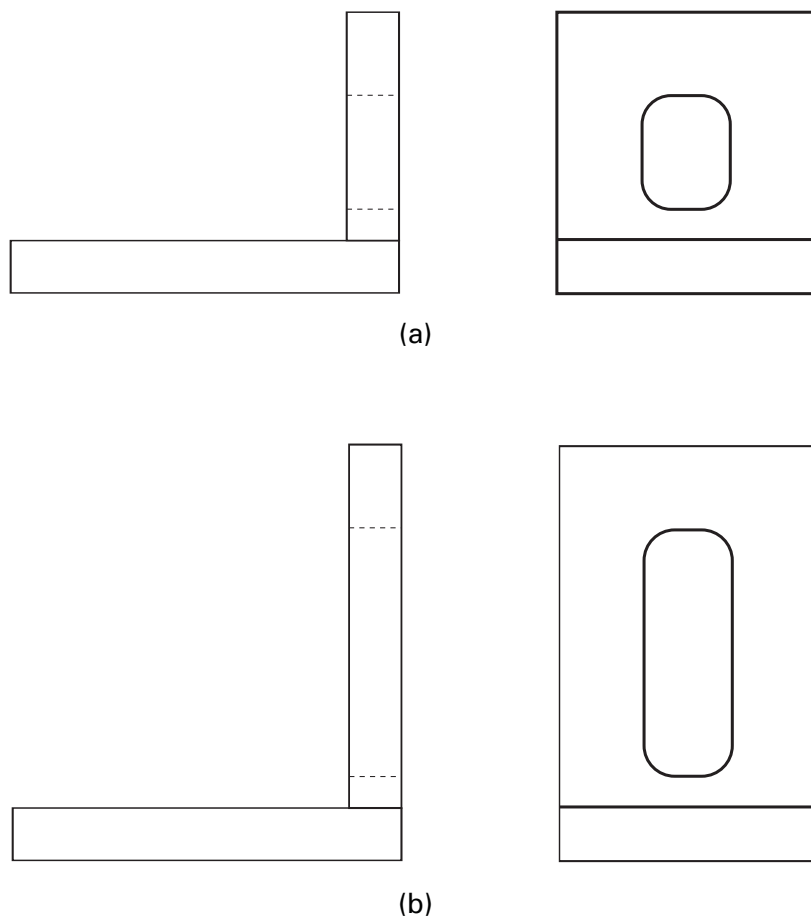


Figura 1 - a) Cantoneira em acrílico para fixação da micropipeta;  
Cantoneiras em acrílico para fixação de microlâmina.

A haste da cantoneira contém um rasgo central, onde é inserido um eixo de acrílico que serve para fixar micropipetas, conforme a figura 2a e duas cantoneiras menores, também feitas de acrílico, ambas com rasgo central, conforme a figura 1b. Nestas cantoneiras são inseridos dois eixos de acrílico, mostrados na figura 2b. Ambos têm um pequeno orifício na extremidade, que permite que sejam afixadas as microlâminas ou micropipetas.

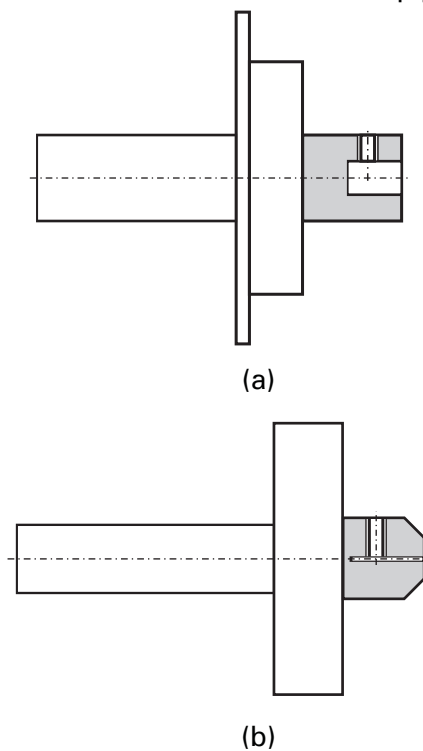
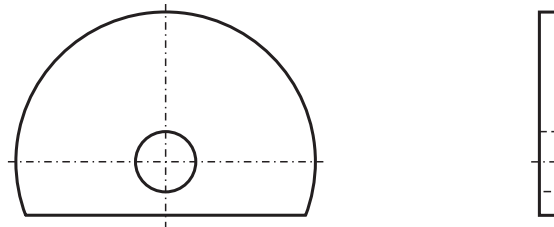
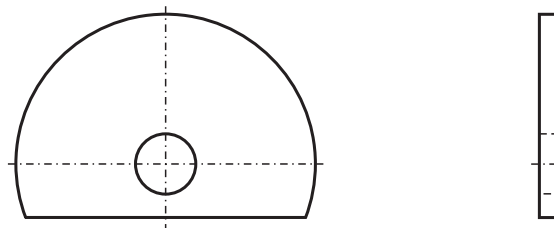


Figura 2 - a) Eixo de acrílico para fixação de micropipeta; b) Eixo de acrílico para fixação de microlâmina.

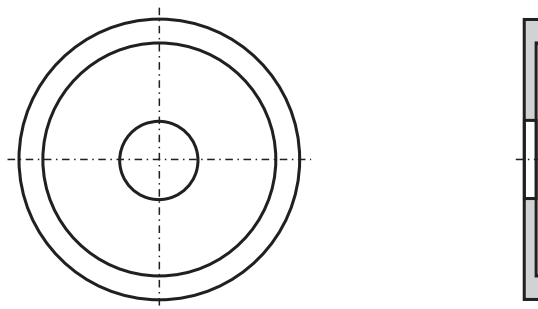
Os eixos são mantidos dentro dos rasgos das cantoneiras por meio de arruelas de acrílico (figura 3), de modo a permitir o movimento do eixo no plano da cantoneira, mas impedindo que o mesmo saia do rasgo.



(a)



(b)



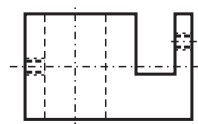
(c)

Figura 3 - Arruelas para fixação dos eixos.

O conjunto de cantoneiras com os respectivos eixos é disposto sobre um vidro plano, conforme mostra a figura 4.



(a)



(b)

Figura 4 - Vidro plano e suportes de fixação e apoio.

Para melhor visualização, a figura 5 ilustra todo o sistema de micromanipulação sobre a placa de vidro e a figura 6 mostra a foto do equipamento montado.

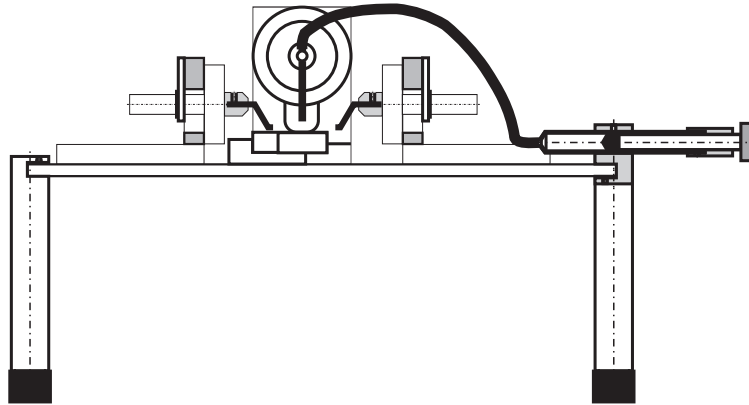


Figura 5 - Vista lateral de todo o conjunto de micromanipulação

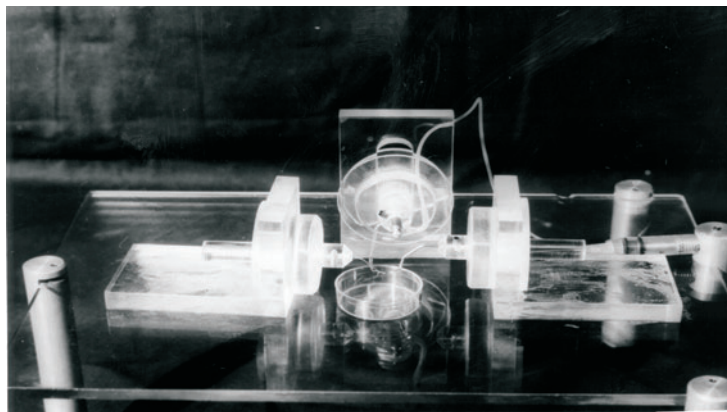


Figura 6 - Foto do micromanipulador montado.

A fixação das bases das cantoneiras à superfície do vidro é feita passando-se fina camada de graxa de silicone entre ambas. Esse procedimento produz aderência entre as partes de acrílico e o vidro, mas permite que os movimentos possam ser realizados de forma suave e isentos de vibrações. O mesmo princípio se aplica às arruelas de acrílico, que impedem os movimentos bruscos nos eixos do micromanipulador. Dessa forma, pode-se ter os



movimentos no plano horizontal, nas direções x e y, deslocando-se as cantoneiras manualmente, bem como no plano vertical, direção z, por meio dos eixos de acrílico presos às arruelas com graxa de silicone. O novo sistema de micromanipulação possibilita, portanto, que o usuário consiga movimentos lineares em todas as direções, além de movimentos de rotação das microlâminas ou micropipetas presas aos eixos de acrílico, o que permite melhor posicionamento das mesmas. Essa versatilidade e maneabilidade faz com que o instrumento seja extremamente eficaz nas operações de micromanipulação de embriões ou inseminação de abelhas.

O conjunto de dois manipuladores acoplados à base permite que um fixe a lâmina para a bipartição do embrião e o outro possa manter o embrião preso na extremidade da micropipeta. Os movimentos nas direções x, y e z, realizados com suavidade e precisão, completam a operação. O uso simultâneo de três manipuladores sobre a base de vidro possibilita a inseminação artificial de abelhas, pois dois manipuladores são usados para expor a cavidade vaginal do inseto e o outro, com a micropipeta acoplada ao sistema de microaspiração, permite a sua introdução para a deposição do sêmen previamente aspirado.

#### **Microaspiração:**

A microaspiração é realizada por um conjunto formado por uma seringa comercial de plástico de 3 ml, sendo que o êmbolo é movimentado para dentro e para fora por meio de um parafuso duplo, que consiste de uma rosca fina e uma rosca grossa (44 e 20 fios por polegada, respectivamente) concêntricas para garantir os deslocamentos macro e micro do êmbolo. Essa seringa é fixada à base de vidro e conectada à micropipeta por meio de uma mangueira de plástico. Isso confere à micropipeta a propriedade de fixar o embrião sem ferir a membrana pelúcida (figura 7).

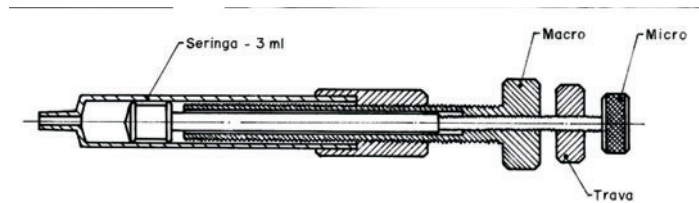


Figura 7 - Seringa de 3 ml adaptada para microaspiração.

### **Micropipeta:**

A micropipeta é confeccionada a partir de um tubo de vidro de 1,5 mm de diâmetro (tubo de microematócrito ou capilar Litz de 130 mm), obedecendo-se à seguinte seqüência: prende-se o capilar no suporte especialmente feito para esse fim e na outra extremidade fixa-se um peso de 0,5 a 3 g, que irá determinar a velocidade de estiramento da micropipeta. Quanto maior o peso, maior a velocidade e, portanto, maior o diâmetro interno da micropipeta. A um bico de Bunsen adapta-se uma agulha hipodérmica de calibre 20, de forma a produzir uma chama delicada, que irá aquecer o tubo até o estiramento, conforme mostra a figura 8.

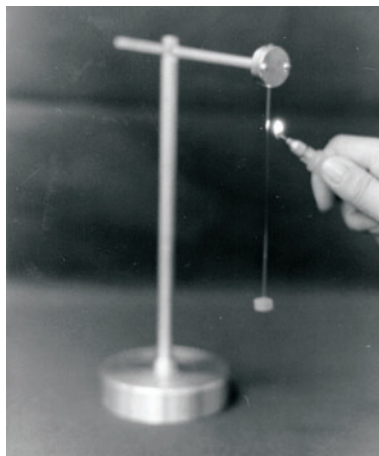


Figura 8 - Estiramento da micropipeta.

A micropipeta esticada deve ter o diâmetro externo de 30 a 50 micra, devendo ser levada ao cortador de pipetas (figura 9) para o corte no comprimento desejado. Esse dispositivo permite o corte em ângulo reto, sem rebarbas. O acabamento final na extremidade da micropipeta é feito na microforja.

#### **Cortador de micropipetas:**

O cortador de micropipetas é constituído de um pequeno motor acionado por pilhas, cuja rotação é controlada por um reostato. Um "mandril" feito de borracha tem a função de fixar a micropipeta e uma pastilha de metal sinterizado, chamada de "vídia", que tem uma face de corte afiada, na qual será feito o corte da micropipeta. A vídia pode ser deslocada sobre a superfície, de forma a permitir o corte a diversos comprimentos, conforme desejado (figura 9). O deslocamento entre o suporte da vídia e a superfície é feito de forma suave, devido à colocação de graxa de silicone. A micropipeta também pode ser cortada manualmente, colocando-a sobre a vídia do cortador manual, mantendo-a comprimida com o dedo enquanto se faz a rotação com a outra mão até se obter o corte (figura 10).

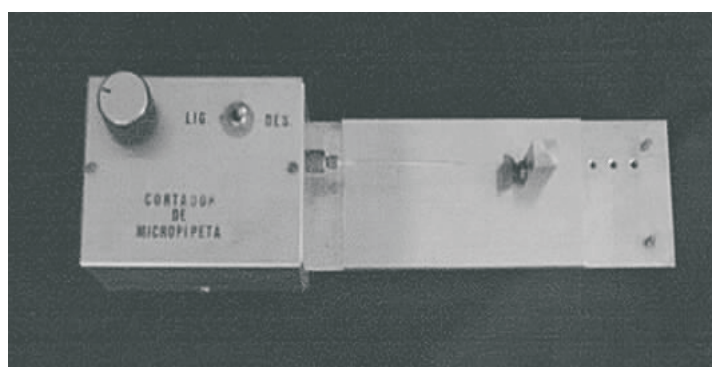


Figura 9 - Cortador de micropipeta.

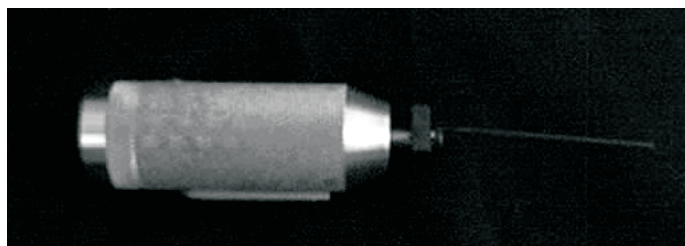


Figura 10 - Cortador manual de micropipeta.

**Microforja:**

A microforja é um dispositivo que se destina a aquecer a ponta da micropipeta para dar o acabamento desejado. Serve, também, para dobrá-la no formato mais conveniente para a aplicação a que se destina. Trata-se de uma adaptação de um instrumento simples conhecido como pirógrafo. O aquecimento da resistência é controlado para incandescer até o ponto desejado, podendo até derreter a ponta da micropipeta (Figura 11). A figura 12 ilustra uma ponta de micropipeta próxima ao fio incandescente.

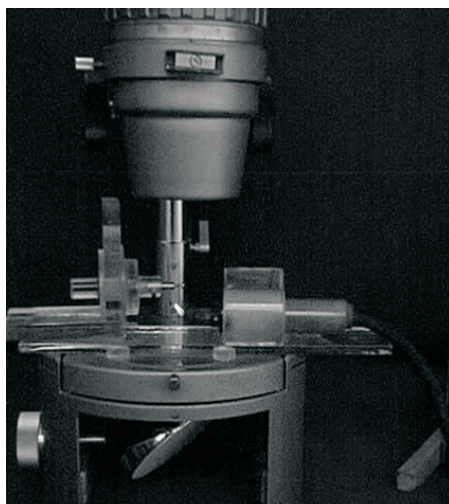


Figura 11 - Foto do sistema de microforja.

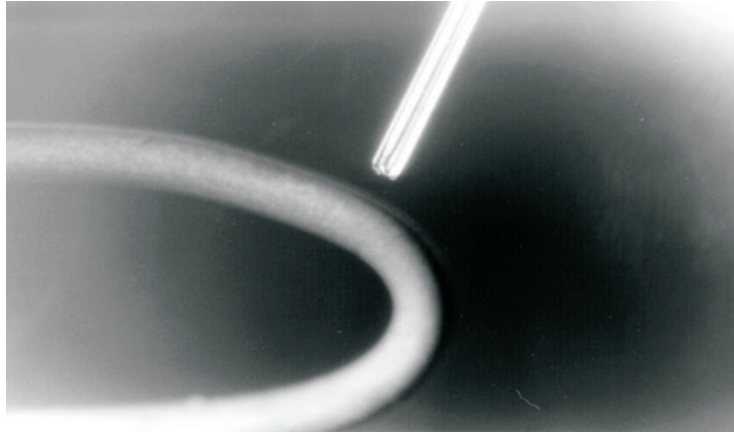


Figura 12 - Micropipeta a ser aquecida para receber acabamento próxima à fonte de calor da microforja (resistência).

Para se obter uma micropipeta acabada, após o corte, prende-se a micropipeta no micromanipulador, aproximando-a da microforja incandescente até que a ponta apresente um perfil arredondado e sem rebarbas, conforme a figura 13.

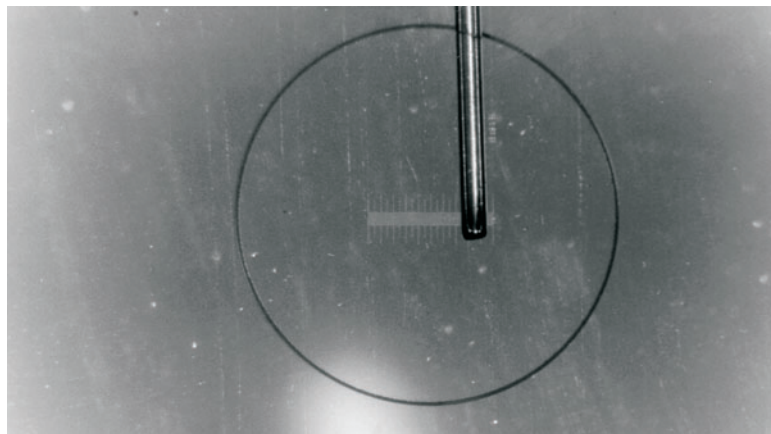


Figura 13 - Detalhe da micropipeta acabada, com a extremidade sem rebarbas.

### **Lâminas para corte de embriões:**

As lâminas para corte de embriões são preparadas a partir de lâminas de barbear comerciais. Com um alicate de retirar cutícula corta-se a lâmina, de modo a se obter um pequeno fragmento. O fragmento obtido é preso com uma pinça hemostática e com um rebolo (de protético) é trabalhado, de forma a se encaixar na haste, que é feita de agulha hipodérmica calibre 40x12. Para preparar a haste, a agulha descartável tem sua ponta limada para a remoção do bisel; em seguida a lâmina é colocada no orifício da agulha, sendo, então, prensada ou <sup>1</sup>colada (figura 14).



Figura 14 - Lâmina e rebolo para acabamento.

Esse procedimento permite o acabamento final da lâmina, o que pode ser visualizado sob lupa. Para facilitar o posicionamento de corte da lâmina dobra-se ligeiramente a haste, sendo posteriormente fixada a um dos conjuntos do micromanipulador. A lâmina pronta, já fixada à haste, pode ser vista na figura 15.



Figura 15 - Lâmina presa à haste e pronta para uso.

---

<sup>1</sup> Araldite Rápido (Ciba-Geigy - Química S/A)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISCEGLI, C.I.; NOVAES, A.P. de; BUGNER, M.; TAMBASCO, A.J.; SILVA, A.E.D.F. da. Manipulação de embriões para pecuária. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.12, n.69, p.68-69, dez. 1990.
- BRACKETT, B.D. A review of bovine fertilization in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v.19, n.1, p.1-15, 1983.
- GORDON, J.W. Transgenic mice: a new and powerfull experimental tool in mammalian developmental genetics. **Developmental Genetics**, New York, v.4, n.1, p.1-20, 1983.
- HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v.48, p.457, 1891.
- HEYMAN, Y.; VINCENT, C. Transplantation: les embryons qui viennent du froid. **Biofutur**, Paris, v.87, n.1, p.38-42, juin 1988.
- KING, W.A. Sexing embryos by cytological methods. **Theriogenology**, Stoneham, v.21, n.1, p.7-17, 1984.
- LIN, T.P. Egg micromanipulation. In: DANIEL JUNIOR, J.C. **Methods in mammalian embryology**. Colorado: W.H. Freeman, 1971. p.157-171.
- LU, T.Y.; MARKERT, C.L. Manufacture of diploid tetraploid chimeric mice. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.77, n.9, p.6012-6016, 1980.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4ª ed. Porto Alegre: Sulina, 1978. 2v.
- MODLINSKI, J. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vitro. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Colchester, v.23, n.2, p.539-547, 1970.
- MOORE, N.W.; ADAMS, C.E.; ROWSON, L.E.A. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.17, n.3, p.527-531, 1968.

- NIBART, M.; BOUYSSOU, B. Le transfert embryonnaire chez les bovins. **Récueil de Médecine Vétérinaire D´Alfort**, Alfort, v.157, n.1, p.71-87, 1981.
- NOVAES, A.P. de; BISCEGLI, C.I.; BUGNER, M.; TAMBASCO, A.J.; FELICIANO SILVA, J.B. Equipamento simples para a micromanipulação de embriões. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.33, n.2, 345-351, ago. 1990.
- OZIL, J.P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.69, n.1, p.463-468, 1983.
- POPESCU, C.P.; CRIBIU, E.P. L'étude cytogénétique de l'embryon bovin. In: CONGRÈS INTERNATIONALE "LE TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LES MAMMIFERES", 2., 1982, Annacy-France. **Proceedings...** Annacy: s.n. 1982. p.277-283.
- SOUZA, D.J. de. **Inseminação artificial da abelha rainha**. Rio de Janeiro: s.n., 1981. 31p. il.
- SUGARAWA, S. In vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes pre-cultured in synthetic media. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION & ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., Urbana-Ill., June 1984. **Proceedings...** Urbana: s.n., 1984. v.4, p.382.
- TARKOWSKI, K.A. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. **Nature**, London, v.184, p.1286-1287, 1959.
- WILLADSEN, S.M. The developmental capacity of blastomeres from 4 and 8 cell sheep embryos. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Colchester, v.65, n.1, p.165-172, 1981.



***Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste***

*Rodovia Washington Luiz, km 234*

*Caixa Postal 339 - Fazenda Canchim*

*CEP 13560-970 - São Carlos - SP*

*Telefone: (016) 272 7611 - Fax: (016) 272 5754*

*e-mail: postmaster@cppse.embrapa.br*

***Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento  
de Instrumentação Agropecuária***

*Rua XV de Novembro, 1452*

*Caixa Postal 741*

*CEP 13560-970 - São Carlos - SP*

*Telefone: (016) 274 24 77 - Fax: (016) 272 5958*

*e-mail: clovis@cnpdia.embrapa.br*