

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

COMPARISON OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUES FOR EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

Isabella Gomes Treur¹, Lucymara De Boer², João Luiz Androukovitch³

1 Aluno do Curso de Medicina Veterinária

2 Aluno do Curso de Medicina Veterinária

3 Professor do Curso de Medicina Veterinária

Resumo

O tema proposto para a pesquisa envolve as técnicas de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sendo elas Direct Transfer (DT) e a Vitriificação (VT), as quais foram avaliadas e comparadas conforme a viabilidade da técnica, e o desenvolvimento pós-descongelamento dos mesmos. Os testes foram realizados em um Laboratório de Fertilização In Vitro, Cenatte Embriões, contando com 12 réplicas de Produção In Vitro (PIV), onde no dia 7 os embriões selecionados no estágio de Blastocisto de grau e qualidade 1 (de acordo com a classificação adotada pelo Laboratório de FIV). Estes embriões (n=418) foram divididos igualmente e dois grupos, sendo: Grupo 1 criopreservados por congelamento lento/Direct Transfer (n=209) e Grupo 2 por Vitriificação (n=209). Os dados foram analisados de forma estatística comparativa sobre as porcentagens de eclosão embrionária, sendo que não houve diferença estatística significativa entre os vitrificados e congelados lentamente (Direct Transfer). Todo o protocolo de meios utilizados para a produção e criopreservação dos embriões é privado e restrito somente ao laboratório, o que torna um desafio para a pesquisa. Nessa pesquisa, não será realizada a comparação entre raças bovinas, pois serão utilizados ovários de animais abatidos em matadouro, ou seja, sem o histórico do animal, tornando assim um desafio a obtenção destes.

Palavras-Chave: Embrião. *In Vitro*. Criopreservação.

Abstract

The proposed research theme involves cryopreservation techniques for bovine embryos produced in vitro, namely Direct Transfer (DT) and Vitrification (VT), which were evaluated and compared according to the viability of the technique and their post-thawing development. The tests were performed in an In Vitro Fertilization Laboratory, Cenatte Embryos, with 12 In Vitro Production (IVP) replicates, where on day 7 the embryos selected at the Blastocyst stage of grade and quality 1 (according to the classification adopted by the IVF Laboratory). These embryos (n=418) were divided equally into two groups, being: Group 1 cryopreserved by slow freezing/Direct Transfer (n=209) and Group 2 by Vitrification (n=209). The data were analyzed in a comparative statistical manner on the percentages of embryonic hatching, and there was no statistically significant difference between the vitrified and slowly frozen (Direct Transfer) embryos. The entire protocol of means used for the production and cryopreservation of embryos is private and restricted to the laboratory only, which makes it a challenge for research. In this research, no comparison between bovine breeds will be made, as ovaries from animals slaughtered in a slaughterhouse will be used, that is, without the animal's history, thus making obtaining them a challenge.

Keywords: Embryo. *In Vitro*. Cryopreservation.

Contato: treurgomesisabella@gmail.com e luis.schiebelbein@cescage.edu.br

1 Introdução

A Produção de Embriões In Vitro (PIVE), tem sido uma alternativa para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, uma vez que permite diminuir o intervalo entre gerações e impedir o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas que não respondem à superovulação, ou que são portadoras de

infertilidade adquirida (Gonçalves et al., 2002).

A primeira etapa da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos consiste na obtenção dos oócitos, seja a partir de ovários de animais vivos (através da aspiração folicular transvaginal) ou através de ovários de animais abatidos ou ovariectomizados. Em seguida a técnica é desenvolvida em três etapas, todas interligadas e realizadas em laboratório: a maturação *in vitro*, a fertilização *in vitro* e o cultivo de zigotos *in vitro*. Esta última etapa é estendida até os estágios de mórula e blastocisto (geralmente alcançado no sétimo dia pós-FIV), quando então os embriões disponíveis poderão ser transferidos ou criopreservados para estoque (Dode; Rumpf, 2002).

A PIV exige um número de receptoras que estejam disponíveis para transferência de um grande número de embriões ao mesmo tempo, com isso temos que criopreservação embrionária permite a estocagem do material genético, preservando suas propriedades, sendo ele então transferido quando há receptoras disponíveis (Sudano et al., 2012).

A criopreservação por sua vez possui como um princípio fundamental a manutenção do metabolismo celular mesmo em baixa atividade, tornando possível o armazenamento dos tecidos e células por período indeterminado (Rodrigues et al., 2000).

Outro princípio da criopreservação é a retirada da água intracelular, antes do processo de congelação, visando a não formação de cristais de gelo, os quais podem vir a danificar o envoltório celular, e também permite que o metabolismo celular continue seu processo mesmo após a congelação (Vajta; Kuwayama, 2006).

Os embriões que são produzidos *in vitro* possuem menor resistência ao processo de criopreservação, quando comparado aos produzidos *in vivo*, fato este relacionado com o acúmulo de lipídios nas células (Sudano et al., 2012). Por esta razão torna-se necessário o uso de crioprotetores, os quais têm a função de declinar o ponto de congelação do meio, fornecendo então um período maior para a remoção da água intracelular do resfriamento prévio ao congelamento da água (Saragusty et al., 2011).

Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidas técnicas para a criopreservação, onde os crioprotetores conforme o método varia suas concentrações e associações. De acordo com cada protocolo estas soluções são adicionadas de uma única vez ou em várias vezes durante as etapas, onde os embriões são criopreservados sob diferentes curvas de resfriamento, ou podendo os mesmos serem mergulhados diretamente em nitrogênio líquido (Gonçalves et al., 2008).

Outra técnica de criopreservação é a Vitrificação, que consiste basicamente em um congelamento ultra-rápido, com grande quantidade de meios crioprotetores, impedindo a formação de cristais de gelo, fazendo a solidificação da água entrando então em um estado vítreo (Kasai et al., 2016). A vitrificação proporciona uma rápida saída de grande parte da água presente no interior das células embrionárias, tornando-as desidratadas e suficientemente permeáveis para o crioprotetor (Vajta; Nagy, 2006).

A técnica de Direct Transfer, ou mais conhecido como congelamento lento, possui como objetivo facilitar o descongelamento e posterior transferência dos embriões para as receptoras, sem a necessidade do uso do laboratório. Baseia-se em uma técnica de congelamento mais lento, objetivando a transferência direta (Gomes; Santos, 2020).

É um processo mais longo, exigindo mais equipamentos de congelação e nitrogênio líquido, exigindo um investimento capital maior. Por mais que esta técnica possua algumas limitações, é um método que se tornou referência com considerável aplicação comercial e industrial, além de oferecer meios comerciais previamente prontos para o processo de congelamento e descongelamento, tornando-se assim referência dentro da criopreservação (Vajta; Nagy, 2006).

O tema proposto para a pesquisa envolve as técnicas de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sendo elas Direct Transfer (DT) e a Vitriificação (VT), as quais serão avaliadas e comparadas conforme a viabilidade da técnica, desenvolvimento pós-descongelamento, levantar hipótese de que os métodos de Vitriificação e Congelamento Lento (DT) dos Blastocistos exibiriam taxas de eclosão semelhantes.

A pesquisa sobre técnicas de criopreservação de embriões bovinos, especificamente comparando a Vitriificação (VT) e o Direct Transfer (DT), possui relevância significativa tanto para a indústria bovina quanto para a ciência reprodutiva por diversos motivos:

Relevância para a Indústria Bovina:

Melhoria Genética e Eficiência Reprodutiva:

As técnicas de produção *in vitro* de embriões bovinos, incluindo a criopreservação, são fundamentais para acelerar a propagação de características genéticas desejáveis em rebanhos. Isso permite a produção de animais geneticamente superiores de maneira mais eficiente e rápida.

Redução de Custos e Aumento da Produtividade:

A escolha da técnica de criopreservação mais eficaz pode reduzir custos operacionais, como aqueles relacionados à manutenção de animais receptoras, uso de instalações de laboratório e tempo de trabalho. Isso resulta em uma maior produtividade do processo de reprodução assistida.

Expansão do Mercado de Reprodutores:

Embriões criopreservados têm potencial para serem comercializados globalmente, ampliando as oportunidades de exportação de genética bovina e fortalecendo o mercado de reprodutores.

Relevância para a Ciência Reprodutiva:

Avanços Tecnológicos e Científicos:

A pesquisa comparativa entre técnicas como Vitriificação e Direct Transfer contribui para o avanço contínuo na compreensão dos processos biológicos envolvidos na criopreservação de embriões. Isso abre portas para melhorias tecnológicas e científicas nas técnicas de reprodução assistida não apenas em bovinos, mas também em outras espécies.

Refinamento e Aprimoramento de Protocolos:

A identificação da técnica de criopreservação mais eficaz para embriões bovinos pode levar ao desenvolvimento de protocolos mais eficientes e seguros, com potencial de aplicação em outras áreas da biotecnologia reprodutiva animal e humana.

Impacto na Conservação de Espécies e Biodiversidade:

Técnicas avançadas de criopreservação são cruciais para a conservação de espécies ameaçadas e a preservação da diversidade genética. Isso é especialmente relevante em um contexto de mudanças climáticas e de pressão crescente sobre os recursos naturais.

2 Material e Métodos

2.1 Tipo de estudo e local de desenvolvimento

Este estudo é uma pesquisa experimental conduzida no Laboratório Produção de Embriões In Vitro, Cenatte Embriões, a qual foi aprovada pela Comissão de Ética em 2023 pelo parecer nº: 01.0668.2022-74.1, utilizando oócitos coletados de ovários de fêmeas bovinas abatidas em um matadouro.

Doze réplicas de embriões PIV foram criopreservadas, sendo que em cada uma das réplicas, no dia 7 (após a FIV), os embriões classificados em estágio de Blastocisto grau 1 (classificação adotada de acordo com o Laboratório de FIV), foram submetidos a dois métodos diferentes de criopreservação: Vitriificação e Direct Transfer (congelamento lento);

Um total de 418 embriões foi criopreservado e distribuído igualmente entre os grupos de congelamento lento (n = 209) e vitriificação (n = 209).

2.2 Coleta dos Oócitos e Maturação In Vitro (MIV)

Os complexos *cumulus* oócito (CCO) foram aspirados utilizando uma agulha de aspiração (18 Gauge), conectado a uma seringa de 20 mL e transferidos para tubos de 50 mL contendo 5 mL de solução de DMPBS. O conteúdo de cada tubo posteriormente passado em filtro específico (WTA®).

Os CCO's foram rastreados, sendo selecionados entre viáveis e desnudos, com base na quantidade de células *cumulus* que os envolvem, com auxílio de estereomicroscópio (STZ745 Nikon®), em seguida lavados duas vezes em meio de lavagem TCM199 contendo sais de Earles, glutamina, NaHCO₃ e HEPES suplementado com piruvato, sulfato de amicacina e soro fetal bovino. Posteriormente, acondicionados em microtubos de tampa rosqueável de dois mL contendo 300 µL de meio de maturação TCM199, contendo sais de Earles, glutamina, NaHCO₃ e suplementado com piruvato, sulfato de amicacina, soro fetal bovino, FSH, LH e estradiol e 200 µL de óleo mineral. Os tubos encaminhados para o Laboratório de Fertilização *in vitro* em um transportador de oócitos aquecido a 38 °C. Os microtubos contendo os oócitos são abertos e levados à incubadora a 38,7°C, 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 24 horas.

2.3 Fecundação In Vitro (FIV)

Após o período de maturação os oócitos maturados serão identificados visualmente pela expansão das células do *cumulus* e utilizados para FIV. É feita a lavagem dos oócitos em meio FIV (protocolo do Laboratório de Fertilização *in vitro*) e acondicionados em placa contendo o mesmo meio estabilizado.

O sêmen escolhido foi de touro da raça Nelore, o mesmo de fertilidade comprovada, o qual foi avaliado igualmente para todos os testes, conforme a motilidade e concentração. As palhetas contendo o sêmen foram descongeladas em banho-maria a 36°C por 40 segundos, e transferido para um tubo de 1,5 ml. Os espermatozoides foram capacitados pelo gradiente de concentração Percoll (protocolo do Laboratório de Fertilização *in vitro*).

O gradiente irá para a centrífuga a 5000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante retirado do tubo, restando apenas o *pellet* ao qual será adicionado 600 µL de meio FIV. O sobrenadante é retirado novamente, e acrescenta-se meio FIV com o dobro do volume do *pellet* e o material é homogeneizado.

Com o auxílio de micropipeta, retira-se a quantidade necessária em µL da solução contendo os espermatozoides capacitados, sobre a gota contendo os oócitos na placa de FIV permanecendo sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ a 38,7°C por 18 horas.

2.4 Cultivo In Vitro (CIV)

Após o período de incubação, os supostos zigotos são lavados e submetidos a pipetagem em meio FIV para retirar o excesso de células do *cumulus* e espermatozoides aderidos. O processo de cultivo, é feito através da transferência dos zigotos para microgotas de 100 µL de meio de cultivo (protocolo do Laboratório de Fertilização *in vitro*) cobertas com óleo mineral por sete dias.

A avaliação da clivagem é realizada 72 horas após a fertilização. Os embriões permanecerão incubados por mais 48 horas atingindo o estágio de blastocisto tornando-se aptos para o congelamento.

2.5 Criopreservação de Embriões

No dia 7, embriões em estágio de Blastocisto, padrão de seleção utilizado igualmente para congelamento em todos os testes, foram selecionados e divididos em dois grupos, grupo 1 criopreservados sob o método de Direct Transfer (congelamento lento) e grupo 2 sob Vitrificação. Foi utilizado o mesmo processo e protocolo para o congelamento, conforme o respectivo método, em todos os testes.

Os blastocistos iniciais, blastocistos eclodidos e com forma e coloração heterogênea em alguns ou vários blastômeros, além da presença evidente de células no espaço perivitelínico e na blastocela com diferenciação celular confusa e forma indefinida, não foram utilizados.

A categorização adotada para classificar se o embrião é apto para o congelamento envolve uma avaliação criteriosa das suas características morfológicas e estágio de desenvolvimento.

Os embriões são classificados de acordo com parâmetros específicos estabelecidos pelo laboratório de FIV (Fertilização *In Vitro*).

Aqui estão alguns critérios utilizados para essa categorização:

Estágio de Desenvolvimento: Os embriões foram observados quanto ao estágio de desenvolvimento alcançado como blastocisto, pois apresenta maior viabilidade após o descongelamento.

Qualidade Morfológica: A qualidade do embrião é avaliada com base em critérios morfológicos como tamanho, forma, textura e uniformidade das células. Embriões com células bem desenvolvidas, compactação adequada e ausência de fragmentação foram preferidos.

Viabilidade Após Descongelamento: Considerou-se também a capacidade do embrião de resistir ao processo de congelamento e descongelamento, garantindo que mantenha suas características estruturais e funcionais.

2.6 Método Direct Transfer

Este processo de criopreservação ocorre em uma máquina de congelamento lento eletronicamente programável, que é ligada ao início do processo, abastecida com nitrogênio líquido.

Os embriões foram classificados e selecionados com micropipeta e acondicionados em macrogotas de 200 μ L de meios crioprotetores específicos em uma placa de 100 mm. Primeiro meio é de lavagem (MLAV) onde foram retirados os resíduos, logo transferidos para uma gota de MCB1 (meio crioprotetor de blastocisto) onde permaneceram por 5 minutos. A próxima gota é de MCB2, onde os embriões ficaram mais 5 minutos, aos 10 minutos completos foram imediatamente transferidos para uma gota de MC, acomodados e envasados em palhetas 0,25 mL.

Para o envase forma feitas colunas do meio MPP nas extremidades da palheta, interceptadas por ar e no centro o embrião em meio MC. Para o fechamento da palheta, foi utilizado um lacrador onde contém uma etiqueta de identificação do embrião.

Aos 29 minutos do início do processo, os embriões foram levados para a máquina, onde é feito imediatamente o *seeding* (utilizando hastes de algodão, fazendo o contato do nitrogênio e as colunas de ar nas palhetas), e a partir disso inicia-se uma nova contagem do tempo na máquina.

Os embriões ficam em torno de uma hora e quarenta minutos na máquina, o abastecimento do nitrogênio é feito em dois tempos, sendo o primeiro aos 30 minutos e segundo aos 40 minutos.

Após este processo, as palhetas são separadas em raques e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

2.7 Descongelamento

Um dia antes do descongelamento foi necessário montar uma placa com gotas contendo o mesmo meio utilizado para o cultivo dos embriões.

A raque contendo os embriões a serem descongelados, são retiradas do botijão e colocadas em outro recipiente de isopor com Nitrogênio para facilitar o manuseio dos embriões, sempre tomando os devidos cuidados para não expor a palheta à temperatura ambiente.

Foi selecionado o embrião a ser descongelado e com auxílio de uma pinça, retirado a palheta do N₂(nitrogênio) da raque e mantido por 10 segundos no ar, posteriormente imergido em banho maria, com água a 30 C° por 20 segundos.

É feita a secagem da palheta com papel toalha seco e limpo, retirar cuidadosamente o lacrador, com auxílio de um aplicador empurrar o conteúdo da palheta com o embrião em uma placa. Através da lupa o embrião foi apreendido com uma pipeta e acondicionado na gota com meio de cultivo, na placa previamente preparada, foi então colocado a placa na incubadora com temperatura e atmosfera controlada. Após 24 horas deste processo, foi feita a avaliação da eclosão dos embriões.

2.8 Vitrificação

Os embriões foram classificados, selecionados e lavados com micropipeta, acondicionados em gotas de 100 μ L de meio base em placa 100 mm. Em sequência, na mesma placa, foi feito uma gota de 200 μ L de SV1, onde ficaram por 3 minutos.

Em seguida, foi feita uma gota de 50 μ L de SV2, e deixada a haste (previamente pronta com etiqueta identificada) com tampa aberta. Aos últimos 10 segundos dos 3 minutos, foi preparado para transferir os embriões para a gota de SV2 com a pipeta, onde ficaram por 15 segundos. Após isso, com auxílio de uma pipeta os embriões precisam ser retirados da gota SV2 com mínimo de meio possível, e em 25 segundos é necessário que sejam depositados na haste. Ao final de 25 segundos, a haste é imediatamente imersa em Nitrogênio líquido (N₂), em um recipiente de isopor (previamente preparado).

Com auxílio de pinças foi introduzido com cuidado a haste na tampa, transferido as hastes para uma raque previamente identificada com caneta, este processo deve ser realizado dentro do N₂. As raques com os embriões em hastes, foram armazenados em um botijão com Nitrogênio.

2.9 Desvitrificação

Os embriões a serem aquecidos (desvitrificados) foram localizados, com auxílio de uma pinça, e retirados das raques identificadas no botijão, e submersos no Nitrogênio em outro recipiente. Os meios de desvitrificação, previamente aquecidos a 38°C, são Aq 1, Aq 2 e Aq 3 (protocolo do Laboratório de Fertilização *in vitro*).

Com uma caneta permanente, foi dividida o fundo da placa de 100 mm em quatro quadrantes (porções) iguais e numerados de um a quatro. A marcação realizada na porção inferior da placa. Com uma pipeta foi feita uma gota de 500 μ L de meio Aq – 1 no primeiro quadrante da placa de 100mm e outra de 500 μ L no segundo quadrante da mesma placa.

Foi feita a retirada da capa da haste com extremo cuidado dentro do nitrogênio e imersa imediatamente na primeira gota de Aq – 1 sobre o foco da lupa, iniciando a contagem do tempo de 5 minutos. Logo, os embriões foram transferidos para a segunda gota de Aq – 2, e no último 1 minuto para o final dos cinco minutos no meio Aq – 1.

Ao final dos 5 minutos, os embriões foram colocados na gota de Aq – 2 e dado início a uma nova contagem do tempo de 5 minutos. Faltando 1 minuto para o final do tempo no meio Aq – 2. Ao final dos 5 minutos, os embriões foram transferidos para uma gota de Aq – 3.

Após acondiciona-los neste meio, são transferidos, através de uma pipeta, em

uma gota com meio de cultivo, na placa previamente preparada, colocada a placa na incubadora com temperatura e atmosfera controlada. Após 24 horas deste processo, é feita a avaliação da eclosão dos embriões.

2.10 Avaliação Pós Descongelamento

O critério adotado para a avaliação foi com base na eclosão dos embriões, ou seja, na taxa de expansão das células e desenvolvimento dessa massa celular, mostrando a viabilidade e sobrevivência dos embriões pós-descongelamento.

Eclodidos: Embriões que completaram a eclosão, onde a massa celular saiu completamente da zona pelúcida.

Eclodindo: Embriões parcialmente eclodidos, onde a massa celular está visivelmente saindo da zona pelúcida.

Não eclodidos: Embriões que não apresentam sinais de eclosão.

Já a avaliação da Expansão Celular, desenvolvimento categorizado em:

Totalmente expandido: Massa celular completamente desenvolvida.

Parcialmente expandido: Massa celular parcialmente desenvolvida.

Sem expansão: Sem sinais de desenvolvimento.

2.11 Dados Coletados

O Quadro 1 a seguir mostra os dados que foram coletados nos doze testes realizados no laboratório:

Quadro 1: Dados coletados para comparação entre os métodos de Criopreservação de Embriões Produzidos *In Vitro*.

TESTE	PRODUÇÃO DE EMBRIÕES	APTOS AO CONGELAMENTO	CONGELADOS DT	CONGELADOS VT
1	56	40	20	20
2	82	60	30	30
3	19	8	4	4
4	72	50	25	25
5	31	18	9	9
6	35	20	10	10
7	51	34	17	17
8	57	46	23	23
9	22	16	8	8
10	61	44	22	22
11	39	28	14	14
12	63	54	27	27
TOTAL	588	418	209	209

Análise Estatística

Os dados coletados de cada teste foram analisados a partir da porcentagem de eclosão sobre os embriões criopreservados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$, conforme o teste do Qui-Quadrado, utilizando 11 graus de liberdade.

Os efeitos pós-descongelamento dos embriões foram avaliados conforme a expansão (eclosão), após 24 horas deste processo.

Em um total de 12 testes, 418 embriões foram analisados, subdivididos igualmente em dois grupos ($n=209$) de acordo com o método de criopreservação utilizado. Após o descongelamento e avaliação da eclosão, a porcentagem de sobrevivência foi determinada com base no número de embriões que eclodiram em relação ao total de embriões criopreservados.

A análise permitiu verificar a eficácia dos métodos de criopreservação comparando as taxas de eclosão e sobrevivência dos embriões após o descongelamento, proporcionando dados estatisticamente significativos sobre os efeitos dos diferentes métodos aplicados.

Nos Quadro 2 e Quadro 3, estão indicados os valores percentuais de cada teste.

QUADRO 2 - Resultados do teste de eclosão dos embriões criopreservados sob o método Direct Transfer.

TESTE DE ECLOSÃO - DT	CRIOPRESERVADOS - DT	DESCONGELADOS - ECLODIDOS (%)
TESTE 1	20	9 45%
TESTE 2	30	6 20%
TESTE 3	4	4 100%
TESTE 4	25	8 32%
TESTE 5	9	3 30%
TESTE 6	10	4 40%
TESTE 7	17	9 53%
TESTE 8	23	8 35%
TESTE 9	8	7 88%
TESTE 10	22	10 45%
TESTE 11	14	8 57%
TESTE 12	27	11 41%
TOTAL	209	87 42%

QUADRO 3 - Resultados do teste de eclosão dos embriões criopreservados sob o método Vitrificação.

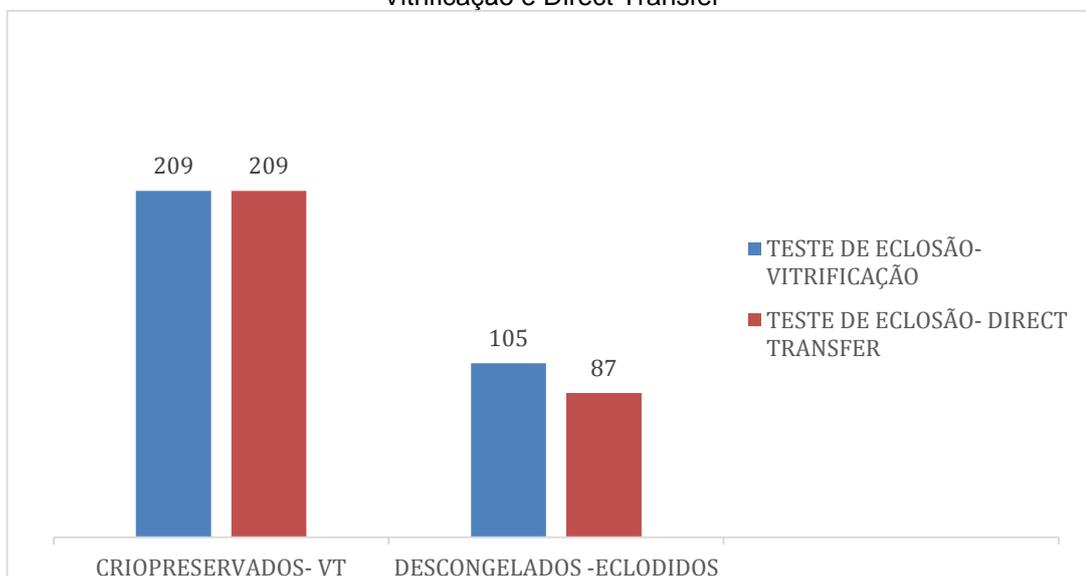
TESTE ECLOSÃO VITRIFICAÇÃO	DE - - VT	CRIOPRESERVADOS - VT	DESCONGELADOS -ECLODIDOS (%)
TESTE 1		20	8 40%
TESTE 2		30	22 73%
TESTE 3		4	3 75%
TESTE 4		25	8 32%
TESTE 5		9	2 22%
TESTE 6		10	4 40%
TESTE 7		17	8 47%
TESTE 8		23	9 39%
TESTE 9		8	6 75%
TESTE 10		22	9 41%
TESTE 11		14	10 71%
TESTE 12		27	16 59%
TOTAL		209	105 50%

3 Resultados e Discussão

Em comparativo entre os métodos de criopreservação, a porcentagem (%) de sobrevivência dos embriões vitrificados foi maior do que as dos embriões congelados lentamente, com valores 50% e 42% respectivamente. Porém não há diferença estatística significativa ($P < 0,05$), sendo 0,998564 e 1,9804 respectivamente.

Pode-se observar melhor este comparativo conforme a Figura 1 abaixo:

Figura 1 - Análise comparativa geral dos testes de eclosão. Parâmetros gerais entre os métodos Vitrificação e Direct Transfer



Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas nas taxas de eclosão entre embriões vitrificados e criopreservados por congelamento lento, a maioria dos estudos relatou resultados superiores com a vitrificação de embriões bovinos PIV, tal como Nunes et al. (2024) a taxa geral de eclosão foi superior nos embriões que passaram pela vitrificação em comparação com aqueles que passaram pelo congelamento lento.

Além disso, Amstislavsky *et al.* (2019) indicaram que a vitrificação é uma opção superior à do congelamento lento para a criopreservação de embriões com alto teor de lipídios, quando comparadas aos de bovinos, ovinos e suínos. Essa vantagem está principalmente ligada à diminuição dos danos criogênicos provocados pela vitrificação nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário (Arshad *et al.*, 2021).

Podemos observar que isso não é um fenômeno recente, mas sim também é resultado de pesquisas antigas, como a pesquisa de Dynnés (1996), segundo ele os comparativos entre a criopreservação por congelamento lento e a vitrificação mostrou resultados variados, mas observou-se que a vitrificação é frequentemente mais adequada para embriões produzidos *in vitro* (Dynnés, 1996). Isso se aplica também para Vajta *et al.* (1998), Berthelot *et al.* (2000), e Martinez et al. (2006), onde segundo eles, embora a congelamento lento continue sendo a técnica predominante para a criopreservação de embriões tanto produzidos *in vivo* quanto *in vitro* na última década, a vitrificação tem sido aplicada a diferentes espécies com sucesso.

A presente pesquisa, apesar de não fornecer diferenças estatísticas, traz um resultado satisfatório com relação a taxa de eclosão, visto que ambas as técnicas são desafiadoras para a sobrevivência do embrião, pois quando produzido *In Vitro* possui uma alta sensibilidade.

Segundo Santos, Alvarez e Borges (2022), ainda há o desafio da menor resistência desses embriões ao processo de criopreservação, uma vez que a alta sensibilidade ao processo tem sido associada ao maior acúmulo de lipídios nas células. Embora a elevada quantidade de lipídios seja um fator limitante para a criopreservação, essas estruturas são necessárias devido à sua importância no fornecimento de energia dentro de qualquer célula.

A importância da escolha da técnica de criopreservação, deve considerar também a infraestrutura disponível e objetivos específicos de reprodução, logo, relacioná-los a aplicabilidade:

Vitrificação:

Embora mais complexa, em relação ao descongelamento, que deve contar com uma estrutura laboratorial, essa técnica pode proporcionar melhores resultados em termos de viabilidade embrionária, especialmente em contextos de reprodução assistida com alto valor genético envolvido, como a PIV.

Direct Transfer:

Oferece uma solução prática e econômica, adequada para operações comerciais que necessitam de rapidez e eficiência, sem a necessidade de descongelamento em laboratório. Assim é possível abordar a exploração das vantagens do Direct Transfer como solução prática e econômica.

Assim confirma Gomes e Santos (2020), segundo estes a técnica de Direct Transfer, ou mais conhecido como congelamento lento, possui como objetivo facilitar o descongelamento e posterior transferência dos embriões para as receptoras, sem a necessidade do uso do laboratório. Baseia-se em uma técnica de congelamento mais lento, objetivando a transferência direta.

Contudo, definitivamente podemos ver que há espaço para novas pesquisas científicas para aprimorar as técnicas de criopreservação de embriões bovinos, tanto a congelação lenta quanto a vitrificação.

A importância dessas pesquisas contribui sob várias pautas, tais como:

Melhoria na Taxa de Sobrevivência:

Novas pesquisas podem focar em melhorar a taxa de sobrevivência e a viabilidade dos embriões após o descongelamento, o que é crucial para aumentar a eficiência das técnicas de reprodução assistida.

Redução de Custos:

A vitrificação é vista como uma alternativa econômica, mas a pesquisa contínua pode encontrar maneiras de tornar ambas as técnicas mais acessíveis e menos dispendiosas, o que pode beneficiar pequenos produtores e laboratórios com recursos limitados.

Adaptação a Diferentes Espécies e Raças:

A maioria dos estudos se concentra em embriões de gado, mas cada raça pode responder de maneira diferente às técnicas de criopreservação. Pesquisas adicionais podem ajudar a adaptar os métodos para obter melhores resultados com diferentes raças bovinas e outras espécies.

Desenvolvimento de Novos Crioprotetores:

A pesquisa pode levar à descoberta e ao desenvolvimento de novos crioprotetores que são mais eficazes ou menos tóxicos, o que pode melhorar significativamente os resultados da criopreservação.

Compreensão dos Mecanismos Celulares:

Compreender melhor os mecanismos celulares envolvidos na criopreservação, pode levar a aprimoramentos nas técnicas atuais e ao desenvolvimento de novas abordagens que minimizem danos celulares.

Aplicações Comerciais:

Com a intensificação da demanda por tecnologias reprodutivas avançadas na pecuária, aprimorar essas técnicas pode ter um impacto direto na indústria, aumentando a produção de animais geneticamente superiores e, conseqüentemente, melhorando a produtividade e a rentabilidade dos sistemas de produção.

Sustentabilidade e Conservação:

Melhorias nas técnicas de criopreservação podem contribuir para a conservação de raças ameaçadas ou em extinção, preservando material genético valioso e aumentando a biodiversidade.

Para enfrentar as dificuldades relacionadas à criopreservação de embriões PIV, diversas pesquisas estão em andamento para encontrar um meio de cultivo que atenda adequadamente às necessidades do desenvolvimento embrionário,

favorecendo sua tolerância durante e sua capacidade de sobrevivência após o processo de criopreservação. Outra linha de pesquisa se concentra em aprimorar a eficiência dos métodos de criopreservação existentes e desenvolver novos métodos. Até o momento, a vitrificação tem mostrado ser o procedimento mais eficaz, apresentando os melhores resultados. No entanto, ainda é necessário padronizar um protocolo eficiente para permitir seu uso mais amplo na prática comercial.

Embora a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos no Brasil tenha alcançado números significativos nos últimos anos, ainda há grande potencial para melhorias, especialmente com a consolidação da criopreservação desses embriões.

Considerando isso, a continuidade das pesquisas é vital, não apenas para resolver as limitações atuais dessas técnicas, mas também para abrir novas possibilidades e aplicações, beneficiando tanto a ciência quanto a indústria.

4 Conclusão

Este estudo comparou a eficácia das técnicas de Vitrificação e *Direct Transfer* (congelamento lento) na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com foco na viabilidade e taxa de eclosão pós-descongelamento.

Em conclusão, ambas as técnicas de criopreservação, Vitrificação e *Direct Transfer*, têm suas vantagens específicas e podem ser escolhidas com base nas necessidades particulares de cada aplicação. A vitrificação oferece uma taxa de sobrevivência ligeiramente superior, sendo especialmente útil para embriões com alto conteúdo lipídico, enquanto o *Direct Transfer* proporciona uma abordagem mais prática e direta, adequada para operações comerciais que buscam eficiência e simplicidade operacional. A continuidade da pesquisa e a inovação tecnológica são fundamentais para aprimorar ainda mais essas técnicas, garantindo maior sucesso na criopreservação de embriões bovinos PIV e contribuindo para a reprodução e melhoramento genético animal.

A escolha entre eles deve ser baseada em uma análise cuidadosa das condições específicas de aplicação e dos objetivos reprodutivos desejados. O estudo contribui para o entendimento das técnicas, fornecendo uma base para futuras pesquisas e aplicações práticas na biotecnologia reprodutiva.

Agradecimentos

Gostaríamos de expressar nossos sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste estudo. Primeiramente, agradecemos ao Professor Dr. João Luis Androukovitch, Professora Dra. Cleide Carine Lazarotto e Luiz Miguel Schiebelbein, por sua orientação, paciência e incentivo ao longo do processo.

Estendemos nossos agradecimentos à empresa, Laboratório Cenatte Embriões, por fornecer os recursos necessários e um ambiente propício para a realização deste estudo, reconhecendo que sem o suporte institucional, o trabalho não teria sido possível.

Também expressamos nossa gratidão aos colegas de laboratório pelo apoio técnico, troca de ideias e colaboração nas etapas práticas do estudo, destacando o companheirismo e entusiasmo que tornaram o projeto uma experiência enriquecedora.

Aos nossos familiares e amigos, agradecemos pelo constante apoio emocional e compreensão durante as longas horas dedicadas à pesquisa, destacando que o incentivo foi essencial para nossa perseverança. Expressamos nosso profundo reconhecimento e gratidão a todos os envolvidos.

Referências

AMSTISLAVSKY, S.; MOKROUSOVA, V.; BRUSENTSEV, E.; OKOTRUB, K.; COMIZZOLI, P. Influência dos lipídios celulares na criopreservação de oócitos de mamíferos e embriões pré-implantacionais: uma revisão. **Biopreservação e Biobanco**, v. 17, n. 1, p. 76-83, 2019. doi: 10.1089/bio.2018.0039.

ARSHAD, U.; SAGHEER, M.; GONZALEZ-SILVESTRY, F. B.; HASSAN, M.; SOSA, F. A vitrificação melhora a sobrevivência embrionária in vitro em embriões de *Bostaurus* sem aumentar a taxa de gravidez após a transferência de embriões quando comparada ao congelamento lento: uma meta-análise sistemática. **Criobiologia**, v. 101, n. 8, p. 1-11, 2021. doi: 10.1016/j.criobiol.2021.06.007.

BERTHELOT, F.; MARINAT-BOTTE, F.; LOCATELLI, A.; PERREAU, C.; TERQUI, M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. **Cryobiology**, v.41, p.116-124, 2000.

DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção in vitro de embriões: eficiência, limitações e perspectivas futuras. In: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília: [s.n.], 2002.

DYNNE'S, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MASSIP, A.; MERMILLOD, P. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. **Theriogenology**, v.46, p.1425-1439, 1996.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Journal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 2000.

GOMES, R. S.; SANTOS, K. X. **Produção e Utilização de Embriões Bovinos por Vitrificação e DirectTransfer**. 2020. p. 886-896.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2008.

KASAI, M. Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 1, p. 1-9, 2016.

MARTINEZ, A.G.; VALCÁCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos. **Small Rum Res**, v.63, p.288-296, 2006.

NUNES, Vanessa Rachele Ribeiro; GREGIANINI, Jennifer Teodoro Ferreira; GREGIANINI, Hélon Aparecido Garcia; FANTIN, Bárbara Souza; LOUREIRO,

Bárbara; SATRAPA, Rafael Augusto. Comparação entre vitrificação e congelamento lento sobre o desenvolvimento pós-descongelamento de embriões bovinos produzidos in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, 44(2), 537–554. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2024v44n2p537>.

RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação in vitro em bovinos; aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 186-187, 2000.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current Progress in Oocyte and Embryo Cryopreservation by Slow Freezing and Vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19, 2011.

SANTOS, Vinícius Soares dos; ALVAREZ, Pedro José; BORGES, Ana Claudia Gomes. **Avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos**. 2022.

SUDANO, M. J. et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, p. 1–8, 2012.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREEVE, T., et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev**, v.51, p.53-58, 1998.

VAJTA, G. **Criopreservação de ovócitos e embriões bovinos produzidos in vitro**. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 85-94, 2000.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Manual of the vitrification of mammalian embryos. 2006.