

Juiz de Fora, MG / Fevereiro, 2024

Vitrificação para transferência direta de embriões bovinos (método VD Embrapa)

Clara Slade Oliveira⁽¹⁾, Naiara Zoccal Saraiva⁽²⁾ e Célio de Freitas⁽¹⁾¹⁾ Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾ Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

Introdução

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial de produção de embriões bovinos. O congelamento destas estruturas permite a formação de bancos de embriões visando a preservação de material genético e o transporte para longas distâncias, como em casos de importações e exportações, além da conservação de embriões para programação logística de uso posterior.

A maioria dos embriões bovinos obtidos in vivo é criopreservada pela técnica de congelamento tradicional, em que ocorre a cristalização, ou seja, formação de cristais de gelo, dos meios de criopreservação. Entretanto, a vitrificação, técnica que evita a formação dos cristais de gelo, é o método de eleição na medicina humana, por retornar resultados superiores (Rienzi et al., 2017).

O obstáculo para adoção da vitrificação para embriões bovinos é o fato da técnica descrita inicialmente não permitir protocolos de transferência direta dos embriões, uma vez que após a descongelação, os embriões necessitam passar por soluções de reidratação e avaliação morfológica da qualidade antes do processo de envase.

Para contornar tal obstáculo, desenvolvemos a técnica “VD Embrapa”, que trata de tecnologia inovadora para reaquecimento dos embriões vitrificados, permitindo a transferência direta do

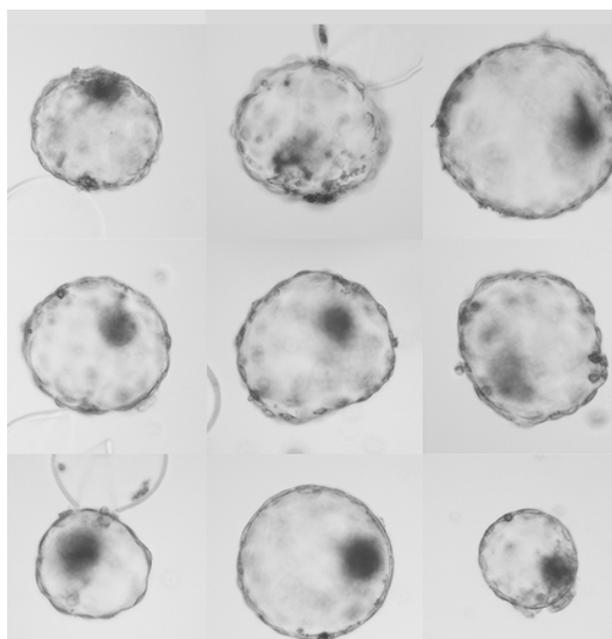


Foto: Clara Slade

Figura 1. Embriões bovinos criopreservados e reaquiados pela técnica Embrapa VD, após 48h de cultivo.

embrião para a receptora, sem a necessidade de procedimentos laboratoriais e mão de obra qualificada. A técnica se mostrou promissora sob o ponto de vista do desenvolvimento embrionário in vitro (Oliveira et al., 2020) e in vivo, em escala piloto, e é descrita detalhadamente neste documento.

Vale destacar que esse estudo contribui para o alcance do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) número 8, contido na Agenda 2030 proposta pela Organização das Nações Unidas (ONU), da qual o Brasil é signatário, com foco na meta 8.2 (Produtividade - Diversificação, modernização tecnológica e inovação), ao prover tecnologia simples e eficaz de criopreservação de embriões, que colabora para a difusão de genética de interesse e aumento da eficiência reprodutiva na pecuária, com o potencial de aumento de produtividade nas cadeias de produção de carne e leite.

Protocolo

Parte 1 - Vitrificação

Materiais:

- Blastocistos grau I produzidos por fertilização in vitro (D7 após a fertilização, preferencialmente no estágio blastocisto expandido - BX).
- Meios MANUTENÇÃO (0,5 mL), VITRI 1 (1 mL) e VITRI 2 (1 mL) (preparados conforme tabelas 1, 3 e 4 anexas e aquecidos a 38 °C. Quantidade sugerida para 10 rodadas - 30 rodadas).
- Aparato da preferência para alocar os embriões (utilizamos palheta para vitrificação das marcas WTA ou Ingamed).
- Aparato da preferência para alocar os embriões (utilizamos palheta para vitrificação das marcas WTA ou Ingamed).
- Placas de 60 mm ou 100 mm estéreis.
- Óleo mineral testado para embriões, no caso de muitos embriões a vitrificar.
- Nitrogênio líquido em caixa de isopor com dimensões aproximadas de 10 cm altura, 37 cm largura e 57 cm comprimento, forrada com papel alumínio (normalmente utiliza-se caixa de 30 L cortada, para reduzir a altura e facilitar a manipulação. O ideal é fixar o papel alumínio com fitas adesivas no fundo e nas laterais da caixa).
- Pinças longas para manipular as palhetas em nitrogênio.
- Cronômetro.
- Caneta de ponta fina apropriada para identificar palhetas.

- Raques apropriadas para palhetas e esparadrapo ou fita para identificação.
- Botijão de nitrogênio líquido.
- Pipetas de 2 µL, 10 µL, 100 µL (a pipeta de 2 µL deve estar bem calibrada e não apresentar retorno, isto é, sobra de meio na ponteira ao apertá-la até o final).
- Ponteiras estéreis para pipetas de 10 µL e 200 µL, de boa qualidade, que se encaixem perfeitamente à pipeta e não tenham rebarbas de plástico na ponta.
- Placa aquecedora.
- Estereoscópio.

Procedimentos

- Fazer microgotas de 20 µL–30 µL de meio MANUTENÇÃO, identificadas, para alocar os embriões. Caso sejam muitos embriões e haja necessidade de mantê-los por mais de 10 minutos até a congelação, recomendamos cobrir a placa com óleo mineral.
- Selecionar os embriões (blastocistos grau I, preferencialmente BX) (Figura 1-A), lavá-los em meio MANUTENÇÃO e transferi-los para as gotas identificadas.
- Identificar os aparatos de vitrificação com os dados desejados (sugestão: estágio, doadora, touro, data).
- Identificar uma placa dividida em duas partes, VITRI 1 e VITRI 2, e acrescentar uma gota de 20 µL – 30 µL de VITRI 1 e uma gota de 20 µL – 30 µL de VITRI 2 nos campos respectivos (Figura 1-B). Essas gotas devem ser trocadas a cada procedimento. Após treinamento, o embriologista pode aumentar o número de aparatos por rodada, fazendo intervalos sequenciais. Nossa equipe executa três procedimentos simultâneos, normalmente, e essa cronologia será demonstrada.
- Incluir o embrião na gota VITRI 1 e acionar o cronômetro. Aguardar 3 minutos (no caso de optar por procedimentos simultâneos, incluir o segundo embrião na segunda gota VITRI 1 após 1 minuto, e o terceiro embrião na terceira gota VITRI 1 após 2 minutos). Fique atento! Capturar o embrião com o mínimo de meio um pouco antes do término do tempo, para transferi-lo com exatamente 3 minutos.

- Incluir o embrião na gota VITRI 1 e acionar o cronômetro. Aguardar 3 minutos (no caso de optar por procedimentos simultâneos, incluir o segundo embrião na segunda gota VITRI 1 após 1 minuto, e o terceiro embrião na terceira gota VITRI 1 após 2 minutos). Fique atento! Capturar o embrião com o mínimo de meio um pouco antes do término do tempo, para transferi-lo com exatamente 3 minutos.
- Transfira o embrião para a gota VITRI 2, pipete duas vezes, e já o capture com o mínimo de meio possível (ideal: 0,5 μ L) e deposite no aparato de vitrificação (Figura 1C). Aguarde 30 segundos e mergulhe rapidamente o aparato no nitrogênio na posição vertical (a extremidade do embrião é resfriada primeiramente, Figura 1D) e solte o aparato na caixa (importante: não resfriar o embrião antes desse tempo, ele deve ser mantido aquecido e longe do vapor de nitrogênio até o momento do mergulho. No caso de optar por procedimentos simultâneos, incluir o segundo embrião na gota VITRI 2 após 4 minutos e prosseguir com a etapa de congelação, e o terceiro embrião fazer o mesmo após 5 minutos).
- Repetir o procedimento, fazendo quantas rodadas forem necessárias até o término dos embriões. Para trabalhos de pesquisa, ou casos em que os embriões não serão destinados à transferência direta, pode-se optar por mais de um embrião por aparato, desde que seja possível respeitar o volume final máximo de 2 μ L no aparato.
- Identificar as raques e retirar o cilindro superior. Guardá-lo.
- Preparar as capas e fechar os aparatos de vitrificação, com auxílio de pinças mergulhadas na caixa de nitrogênio líquido (Figura 1E), conforme orientações do fabricante.
- Mergulhar as raques na caixa de nitrogênio líquido e alocar as palhetas (Figura 1F). Fechar a raque utilizando o tubo sobressalente, na posição invertida (Figura 1G).
- Transferir as raques para o botijão de nitrogênio líquido.

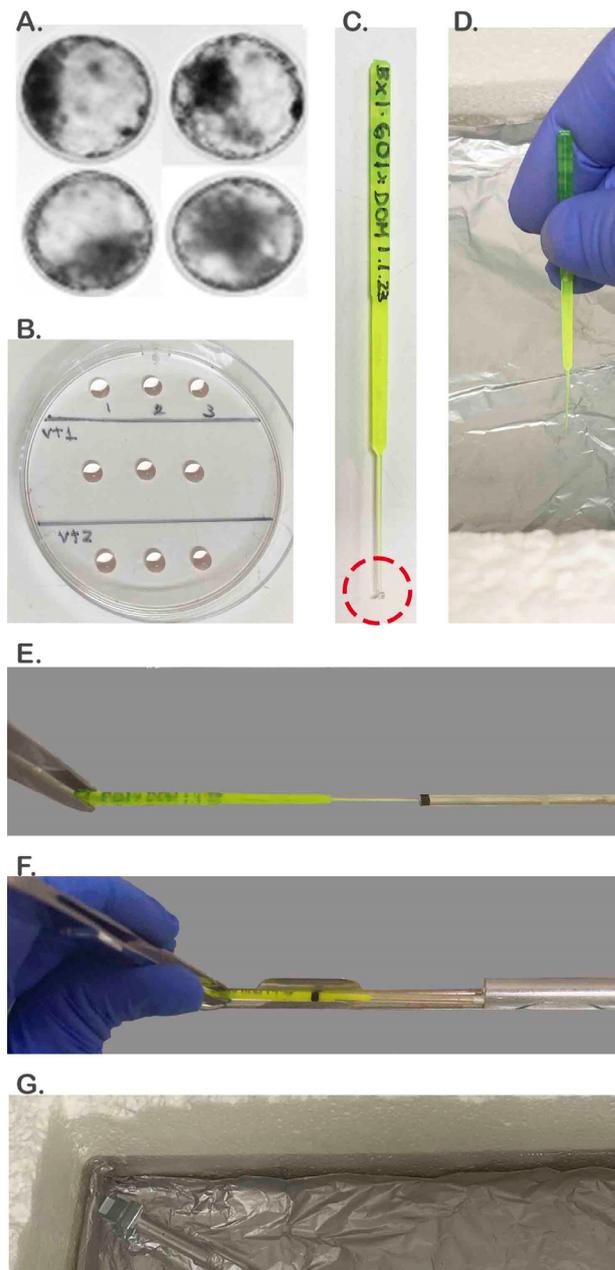


Foto: Clara Slade

Figura 1. Procedimentos de vitrificação dos embriões. (A). Embriões no estágio blastocisto expandido, selecionados para o procedimento; (B). Placa para o procedimento, contendo gotas de meio MANUTENÇÃO identificadas com 1, 2 e 3, contendo os embriões destinados à vitrificação separados por doadora. Na segunda linha da placa, três gotas de meio VITRI 1. Na terceira linha, três gotas de meio VITRI 2, (C). Gota de meio VITRI 2 contendo o embrião, posicionada em aparato de vitrificação; (D). Aparato contendo o embrião mergulhado em nitrogênio líquido; (E). Fechamento do aparato de vitrificação, no interior do nitrogênio líquido; (F). Acondicionamento dos aparatos de vitrificação, fechados, em raques identificadas, mergulhados em nitrogênio líquido; (G). Fechamento da raque com globet superior encaixado ao contrário, mergulhado em nitrogênio líquido.

Parte 2 - Transferência direta

Materiais

- Receptoras de embriões aos sete dias após a ovulação, apresentando exame ginecológico prévio.
- Palhetas de 0,25 mL para envase dos embriões.
- Aplicador para transferência de embriões.
- Pinças longas para manipular as palhetas em nitrogênio.
- Bainha para transferência de embriões.
- Meios PBS (10 mL, comercial) e REAQUECIMENTO (6 mL, preparado conforme tabela 5 anexa) (quantitativo sugestivo para 30 procedimentos).
- Seringa de 1 mL (por exemplo, seringas para aplicação de insulina) acoplada a ponteira de 200 µL invertida.
- Nitrogênio líquido em caixa de isopor (conforme descrito anteriormente).
- Formulário para anotação das informações dos embriões e receptoras (data da TE, número da receptora, dados do embrião: doadora, touro, data da vitrificação).
- Cronômetro.
- Placa aquecedora.
- Papel toalha.

Procedimentos

- Preparar as palhetas de reaquecimento para a quantidade de receptoras disponível, conforme anteriormente descrito.
- Inserir a palheta na seringa de 1mL acoplada à ponteira, e puxe aproximadamente 200 µL de PBS (até que a palheta esteja pela metade).
- Puxar um pouco de ar para fazer uma coluna de aproximadamente 1 cm.
- Completar a palheta, até a borda, puxando meio REAQUECIMENTO (Figura 2A).
- Secar a parte externa das palhetas com papel toalha.
- Repousar as palhetas em placa aquecedora (Figura 2-B).

- Iniciar o preparo da receptora, conforme protocolo de transferência utilizado (contenção, higienização e anestesia).
- Transferir a raque com os embriões desejados para a caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Abrir o cilindro de fechamento da raque, localizar o embrião de interesse e abrir o aparato de vitrificação, mergulhado em nitrogênio, com o auxílio da pinça.
- Posicionar o aparato de vitrificação na posição vertical, com a ponta contendo o embrião ainda mergulhada no nitrogênio líquido e a outra extremidade na pinça, já fora do nitrogênio (Figura 2-D). Segurar com a mão direita. Com a mão esquerda, segurar a palheta também na posição horizontal, com a abertura para cima.
- Em um movimento rápido e preciso, mover o aparato de vitrificação, de forma que a ponta contendo o embrião saia do nitrogênio líquido e entre na palheta contendo meio REAQUECIMENTO em aproximadamente 3 segundos (Figura 2C).
- Acione o cronômetro.
- Aguarde até perceber que o meio do aparato, que continha o embrião, dissolveu completamente, e retire o aparato. Mantenha a palheta em posição vertical por aproximadamente 1 minuto, para que o embrião percorra a coluna do meio REAQUECIMENTO, e em seguida iniciar a montagem do aplicador ou mantê-la por mais tempo na placa aquecedora, em posição horizontal, conforme conveniência. O importante é que o embrião seja mantido aquecido (na placa ou na vaca) e que só seja aplicado (saída da palheta) transcorridos 6 minutos no meio REAQUECIMENTO.
- Aplicar o embrião no corno ipsilateral ao corpo lúteo, quando o cronômetro marcar 6 minutos. As imagens da Figura 2D correspondem a embriões 24 horas após o reaquecimento.

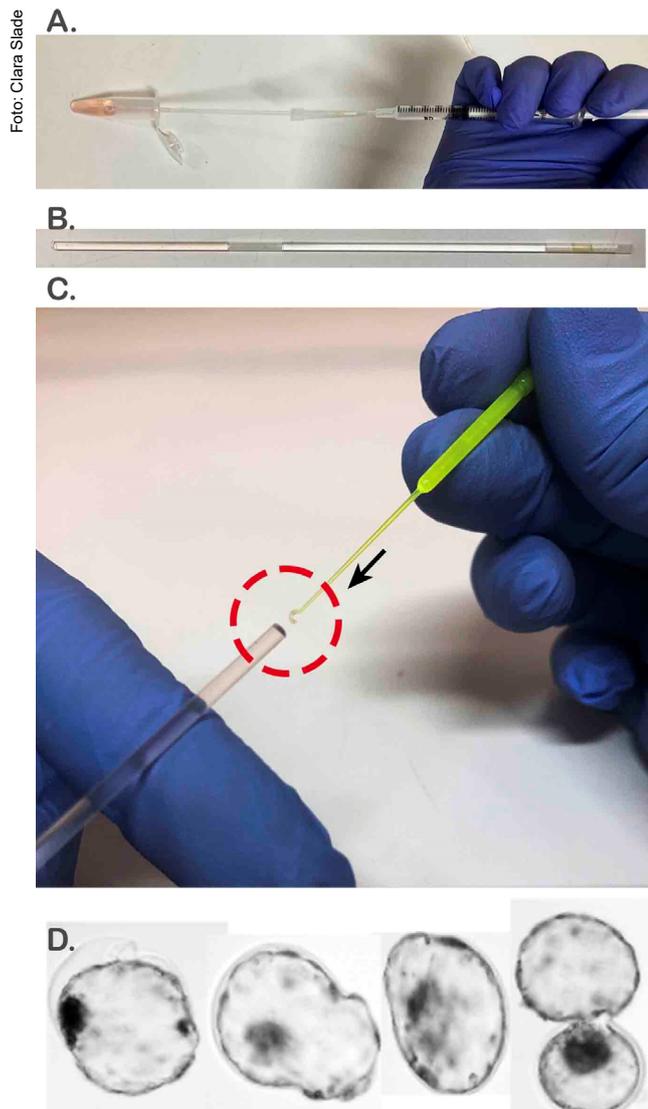


Figura 2. Montagem das palhetas para reaquecimento dos embriões, preenchendo com meio PBS, ar e meio REAQUECIMENTO. B. Palheta montada, pronta para receber embriões vitrificados. C. Alocação do aparato de vitrificação na palheta para reaquecimento. D. Embriões vitrificados e reaquecidos utilizando a presente técnica, após cultivo por 48h.

Comentários

Observar os pontos abaixo para garantir sucesso com a técnica:

- pH dos meios (devem estar conforme indicador de pH, tons salmão, vermelho, nunca rosa).
- Troca de meio de gotas pequenas em intervalos frequentes, para não alterar a osmolaridade.
- Ajuste rigoroso do volume e precisão da pipeta de vitrificação, para não perder embriões durante o procedimento.
- Rapidez para mergulhar o aparato com o embrião no nitrogênio (vitrificação) e na palheta (reaquecimento).

Queremos receber críticas e sugestões para aprimorar esta técnica. Favor reportá-los por e-mail: clara.oliveira@embrapa.br e naiara.saraiva@embrapa.br

Meios: MANUTENÇÃO, VITRI 1 e VITRI 2 REAQUECIMENTO

Tabela 1. Meio de manutenção.

Meio MANUTENÇÃO	10 mL
TCM 199 Hepes Gibco (Thermo #12340030-01)	9 mL
SFB filtrado	1 mL
Solução de piruvato sódico	20 µL
Pen Strep (Sigma #P4458 ¹)	50 µL

Caso o meio não apresente coloração adequada, pode-se utilizar solução HEPES (H3662) para ajustar o pH, conforme orientações do fabricante.

¹ Pode ser substituído por outro antibiótico em uso no laboratório.

Tabela 2. Solução de piruvato sódico.

Solução de piruvato sódico	1 mL
Piruvato Sódico (Sigma #P2256)	0,011 g
Água milli-q ou TCM 199 Hepes	1 mL

Tabela 3. Meio VITRI.

Meio Vitri 1	1 mL
Meio MANUTENÇÃO	850 µL
Etilenoglicol (Sigma #102466)	75 µL
DMSO (Sigma D2650)	75 µL

Tabela 4. Meio VITRI 2.

Meio VITRI 2	1 mL
Etilenoglicol	160 µL
DMSO	160 µL
Sacarose (Sigma #S1888)	0,171 g

Tabela 5. Meio REAQUECIMENTO.

Meio REAQUECIMENTO	10 mL
Meio MANUTENÇÃO	10 mL
Sacarose (Sigma #S1888)	0,513 g

Referências

OLIVEIRA, C. S.; FEUCHARD, V. L. D. S.; FREITAS, C. de; ROSA, P. M. D. S.; CAMARGO, A. J. D. R.; SARAIVA, N. Z. In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. **Cryobiology**, v. 97, p. 222-225, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.007>

RIENZI, L.; GRACIA, C.; MAGGIULLI, R.; LABARBERA, A. R.; KASER, D. J.; UBALDI, F. M.; VANDERPOEL, S.; RACOWSKY, C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 2, p. 139-155, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw038>

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco
36038-330 Juiz de Fora, MG
<https://www.embrapa.br/gado-de-leite>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Jorge Fernando Pereira*

Secretário-executivo: *Carlos Renato Tavares de Castro*

Membros: *Adilson Ferreira da Mota, Cláudio Antônio Versiani Paiva, Deise Ferreira Xavier, Edna Froeder Arcuri, Fausto de Souza Sobrinho, Fernando César Ferraz Lopes, Francisco José da Silva Ledo, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Jackson Silva e Oliveira, Juarez Campolina Machado, Leovegildo Lopes de Matos, Luiz Ricardo da Costa, Márcia Cristina de Azevedo Prata, Marta Fonseca Martins, Pérsio Sandir D'Oliveira, Rui da Silva Verneque, Virginia de Souza Columbiano, William Fernandes Bernardo*

Comunicado Técnico 097

ISSN- 1678-3123 / e-ISSN 1678-3131
Fevereiro, 2024

Edição executiva: *Carlos Renato Tavares de Castro, Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto: *Carlos Renato Tavares de Castro*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro (CRB-6/2749)*

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Luiz Ricardo da Costa*

Publicação digital: PDF

