

Juiz de Fora, MG / Abril, 2024

## Processo Embrapa VD para vitrificação e transferência direta de embriões bovinos

Clara Slade Oliveira<sup>(1)</sup>, Naiara Zoccal Saraiva<sup>(2)</sup>, Viviane Luzia da Silva Feuchard<sup>(3)</sup> e Celio de Freitas<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(2)</sup>Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(3)</sup>Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>(4)</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

**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](http://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, Virgínia*

*de Souza Columbiano, William*

*Fernandes Bernardo*

Edição executiva

*Clara Slade Oliveira*

Revisão de texto

*Carlos Renato Tavares de Castro*

Normalização bibliográfica

*Rosângela Lacerda Castro (CRB-*

*6/2749)*

Projeto gráfico

*Leandro Sousa Fazio*

Diagramação

*Luiz Ricardo da Costa*

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

**Resumo**—A vitrificação de embriões produzidos in vitro, embora recomendada na medicina humana, não é amplamente adotada na bovinocultura. Isso se deve à necessidade, prevista no protocolo de vitrificação usual, de reaquecimento e avaliação em laboratório dos embriões antes da transferência. Essa etapa é um complicador para a adoção da vitrificação como técnica de eleição e favorece as técnicas de congelamento existentes, de transferência direta. Para facilitar a utilização da vitrificação em escala comercial na bovinocultura leiteira, desenvolvemos um processo de reaquecimento de embriões vitrificados na fazenda, para transferi-los diretamente para receptoras, extinguindo a etapa convencional de avaliação em laboratório. Neste documento, apresentamos dados dos embriões submetidos ao protocolo Embrapa VD, cultivados in vitro em laboratório por 48 horas para avaliação de sua qualidade (experimento 1), ou transferidos para receptoras para avaliação do estabelecimento de gestação e seu acompanhamento (experimento 2,). Em estudo in vitro, identificamos que já após duas horas de cultivo, 95,6% dos embriões Embrapa VD estavam reexpandidos. A taxa de eclosão dos embriões Embrapa VD foi inferior ( $p < 0,05$ ) à de embriões frescos com 24 horas de cultivo (d8) (31% vs 57%), mas com 48 horas (d9) foi similar (44% vs 66%). Não houve diferença no número de células após 48 horas de cultivo (d9) ( $149 \pm 64$  vs  $163 \pm 52$ ). No experimento in vivo, observamos taxas similares de prenhez (33% vs 44%), nascimento (26% vs 35%) e perdas gestacionais (22% vs 20%) entre embriões Embrapa VD e frescos. Concluimos que o protocolo Embrapa VD permite a transferência direta de embriões bovinos vitrificados, proporcionando índices satisfatórios de prenhez e nascimentos e simplifica o processo de vitrificação ao eliminar a etapa de avaliação embrionária pós descongelamento.

**Termos para indexação:** criopreservação, congelamento, fertilização in vitro (FIV).

## Embrapa VD method for vitrification and direct transfer of bovine embryos

**Abstract** – Vitrification of in vitro produced embryos, although recommended in medicine, is not widely adopted in cattle. This is due to the laboratory step in the usual vitrification protocol, to warm and evaluate the embryos before transfer. This step favors existing direct transfer techniques instead of vitrification. In order to facilitate the use of vitrification on a commercial scale in dairy cattle, we have developed a vitrification process that involves embryo warming and direct transfer to recipients on the farm, eliminating the conventional laboratory evaluation step. In this bulletin, we present data from embryos submitted to the Embrapa VT protocol, cultured for 48 hours to evaluate their quality (experiment 1, in vitro), or transferred to recipients for pregnancy establishment evaluation and its follow-up (experiment 2, in vivo). In vitro, we identified that after two hours of culture, 95.6% of Embrapa VT embryos were re-expanded. The hatching rate of Embrapa VT embryos was lower ( $p < 0.05$ ) than fresh embryos after 24h of culture (d8) (31% vs 57%), but with 48h (d9) it was similar (44% vs 66%). There was no difference in the number of cells after 48 hours of culture (d9) ( $149 \pm 64$  vs  $163 \pm 52$ ). In the in vivo experiment, we observed similar rates of pregnancy (33% vs 44%), birth (26% vs 35%) and pregnancy loss (22% vs 20%) between Embrapa VT and fresh embryos. We conclude that the direct transfer of vitrified bovine embryos is possible using the Embrapa VT protocol, providing good pregnancy and birth rates and simplifying the vitrification process by eliminating post-thawing embryo evaluation stage.

**Index terms:** cryopreservation, slow freezing, in vitro fertilization (IVF).

### Introdução

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial de produção de embriões bovinos. Considerado o maior produtor mundial de embriões entre 2012 e 2013, tornou-se líder no uso da produção in vitro de embriões (PIVE) e definiu tendências que seriam observadas nos anos subsequentes em diversos países (Viana et al., 2017). Para viabilizar a disponibilização dessa tecnologia ao setor produtivo, tanto em mercado nacional quanto mercado externo, é fundamental que haja evolução concomitante da PIVE à criopreservação.

Dentre as vantagens do uso de embriões criopreservados, podemos relacionar o potencial de redução no uso de hormônios, a prevenção de introdução de patógenos com a compra de receptoras prenhes, e a facilidade de transporte. Com isso, a criopreservação permite a formação de bancos de embriões visando à preservação de material genético e transporte de longa distância, como em casos de importações e exportações, conservação de embriões de programa de PIVE e de transferência de embriões (TE) e vantagens na programação logística para uso posterior.

Quando são utilizados embriões produzidos por fertilização in vitro (FIV), os melhores resultados são geralmente obtidos pela técnica de vitrificação, que é o procedimento de eleição na medicina humana por ser comprovadamente menos danoso aos embriões e retornar melhores resultados, quando comparada ao congelamento lento (Li et al., 2014; Rienzi et al., 2017).

A vitrificação é assim denominada devido ao fato das soluções super-resfriadas diretamente em nitrogênio líquido se solidificarem sem cristalização, e, devido à alta viscosidade, formam um estado vítreo transparente (Schiewe; Anderson, 2017). Assim, os meios de criopreservação sofrem passagem direta do estado líquido para um estado vítreo e amorfo, sem que haja uma cristalização do meio. A metodologia, se desenvolvida em condições adequadas, apresenta inúmeras vantagens como a rapidez da técnica e a simplicidade de execução, já que não há a necessidade de equipamentos específicos, como o congelador de embriões, requerido para os protocolos de congelamento lento. Contudo, a principal vantagem refere-se à ausência de danos osmóticos, físicos e fisiológicos às funções celulares, causado pela formação de cristais de gelo, comuns em outras técnicas de criopreservação (Saragusty; Arav, 2011), sendo essa a técnica de escolha para criopreservação de embriões produzidos in vitro.

Mesmo que a vitrificação seja a técnica de eleição para criopreservação de embriões na medicina humana, a maioria dos embriões bovinos obtidos in vivo ainda é criopreservada pela técnica de congelamento tradicional, na qual ocorre a cristalização, ou seja, formação de cristais de gelo, dos meios de criopreservação. A preferência pela congelação lenta se deve ao fato da técnica permitir a transferência de embriões bovinos diretamente às receptoras, com resultados satisfatórios de desenvolvimento pós transferência (Sanchez et al., 2016). Na metodologia convencional de vitrificação de embriões bovinos, está prevista etapa de

reaquecimento dos embriões em laboratório, em soluções seriadas de sacarose, e a avaliação dos embriões antes do envase para a transferência (Vajta et al., 1998). Portanto, a principal demanda atual do setor produtivo na bovinocultura é por embriões que possam ser transferidos sem necessidade de manipulação após o descongelamento da palheta.

Ao considerarmos a técnica de vitrificação mais apropriada à criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, devido às particularidades fisiológicas dessas estruturas, ainda existe um gargalo para adoção eficiente do processo pelo setor produtivo, que é o fato dos protocolos atualmente disponíveis não permitirem a transferência direta dos embriões, uma vez que após a descongelação, os embriões necessitam passar por soluções de reidratação. Além da técnica requerer alta concentração de crioprotetores, também demanda uma pessoa qualificada para realizar a avaliação morfológica da qualidade do embrião antes do processo de envase.

Em publicação recente (Oliveira et al., 2020), apresentamos um método mais simples para reaquecimento dos embriões, produzidos *in vitro*, vitrificados, com resultados benéficos à sobrevivência após o reaquecimento. O processo Embrapa DT, detalhado a seguir, se mostrou promissor sob o ponto de vista de desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo*, em escala piloto. Porém, carecia de validação a campo, com a transferência *in vivo* de número amostral suficiente de embriões para receptoras.

Neste documento, buscamos detalhar o processo agropecuário denominado “Embrapa VD”, que trata de tecnologia inovadora para reaquecimento de embriões vitrificados, permitindo a transferência direta do embrião para a receptora, sem a necessidade de procedimentos laboratoriais e mão de obra qualificada. Ainda apresentamos resultados recentes dos índices de prenhez obtidos com o uso dessa tecnologia no Campo Experimental de Santa Mônica da Embrapa Gado de Leite, localizado em Valença, RJ. Com a adoção da metodologia proposta, esperamos reduzir o uso de hormônios na sincronização de estro das receptoras e facilitar a difusão de genética superior de embriões criopreservados por meio da execução de uma técnica mais simples, acessível e com facilidades logísticas para o uso de embriões criopreservados, que trará impactos positivos diretos no cenário produtivo.

A tecnologia desenvolvida está associada ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável nº 2 – FOME ZERO, contribuindo para o alcance da Meta

2.1 (Alimentos seguros, nutritivos e suficientes) ao colaborar para a difusão de recursos genéticos de interesse e, conseqüentemente, para o aumento da eficiência reprodutiva na pecuária, com o potencial de aumento de produtividade nas cadeias de produção de carne e leite.

## Material e métodos

### Desenho experimental

Avaliamos o processo Embrapa VD na vitrificação e reaquecimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, em comparação com embriões frescos. Inicialmente, as avaliações foram realizadas *in vitro* (experimento 1), em condições experimentais de laboratório. Nesta etapa, blastocistos produzidos *in vitro* a partir de oócitos de abatedouro foram vitrificados/reaquecidos pelo método Embrapa VD no d7 do desenvolvimento, e cultivados paralelamente a embriões frescos. As taxas de expansão e eclosão dos blastocistos e o número de células totais após 48 horas de cultivo foram avaliados e comparados entre grupos (Fresco: embriões controle não vitrificados; Embrapa VD: embriões vitrificados/reaquecidos método Embrapa VD). Na segunda parte do estudo, embriões Girolando, produzidos *in vitro* a partir de oócitos de doadoras Girolando, foram criopreservados/reaquecidos pelo método Embrapa VD no d7 do desenvolvimento, e transferidos para receptoras de embriões paralelamente a embriões frescos, para avaliação de prenhez e perdas gestacionais (experimento 2). Os procedimentos seguiram as diretrizes para experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Embrapa Gado de Leite, Protocolo 6079110919).

### Coleta de oócitos por aspiração folicular

Embriões bovinos foram produzidos *in vitro*, a partir de oócitos de ovários de abatedouro (experimento 1) ou a partir de oócitos obtidos de doadoras Girolando (½ Gir ½ Holandês), por aspiração folicular (experimento 2). Os detalhes utilizados para a produção dos embriões foram descritos por Oliveira et al. (2022).

Doadoras de oócitos F1 (composição racial ½ Gir ½ Holandês) foram selecionadas pela composição genética e pela ausência de patologias reprodutivas. Os animais foram submetidos à aspiração de folículo dominante 72 horas antes da aspiração folicular para recuperação de oócitos, para sincronização de onda folicular. A aspiração folicular foi realizada após anestesia epidural com

3 mL - 4 mL de cloridrato de lidocaína 1% (30 mg - 40 mg) e higienização vaginal do animal, com o auxílio de guia acoplada a ultrassom e bomba de vácuo para recuperação dos complexos cumulus oócitos, conforme detalhado por Slade Oliveira et al. (2019).

### **Produção in vitro de embriões**

Embriões bovinos foram produzidos in vitro, a partir de oócitos de ovários de abatedouro (experimento 1) ou a partir de oócitos obtidos de doadoras Girolando (½ Gir ½ Holandês), por aspiração folicular (experimento 2). Os detalhes utilizados para produção de embriões estão descritos em artigos anteriores (Oliveira et al., 2022).

### **Vitrificação dos embriões**

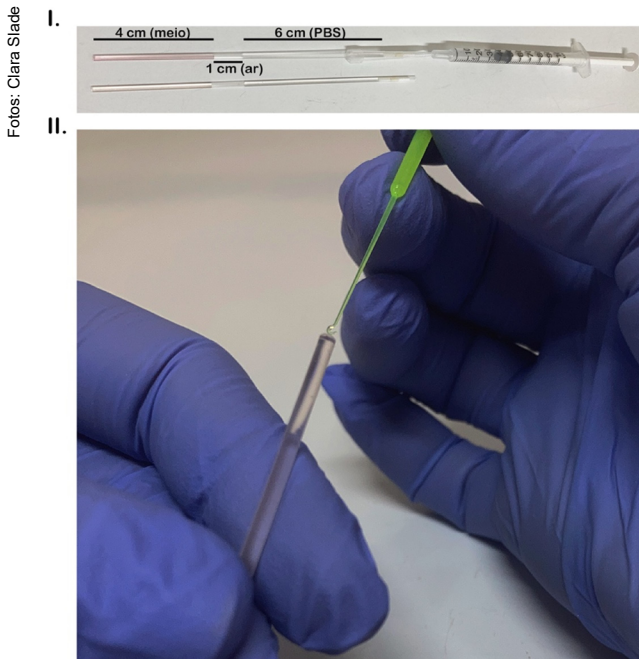
A vitrificação foi realizada em grupos de cinco embriões no experimento 1 e individualmente no experimento 2, conforme metodologia descrita por Vajta et al. (1998), com adaptações descritas a seguir. Blastocistos expandidos classificados morfológicamente como grau 1 foram selecionados no d7 para o procedimento. O meio de manutenção foi usado como base para todos os procedimentos (TCM-199 tamponado com HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado com 1,0 mM de piruvato de sódio (Gibco BRL, Grand Island, NY), 100 UI de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina). Para vitrificação, os meios utilizados foram Vitri 1 (meio de manutenção suplementado com 10% de soro fetal bovino, 7,5% de DMSO e 7,5% de etilenoglicol) e Vitri 2 (meio de manutenção suplementado com 10% de soro fetal bovino, 16% de DMSO, 16% de etilenoglicol e solução de sacarose 0,5 M). Os embriões selecionados foram transferidos para 70 µl de meio Vitri 1 por 3 min. Em seguida, os embriões foram transferidos para 70 µl de meio Vitri 2 e colocados em um dispositivo de vitrificação aberto ("garfo" de vitrificação, WTA, Cravinhos, Brasil) em uma gota de 0,5 µl. Este protocolo de vitrificação associa sacarose e alta concentração de crioprotetores para rápida desidratação. Após 30 segundos, o dispositivo foi imerso em nitrogênio líquido. Em seguida à vitrificação, os embriões foram armazenados em botijões de nitrogênio líquido.

### **Reaquecimento dos embriões**

Experimento 1 - O reaquecimento foi realizado transferindo o dispositivo de vitrificação imediatamente do nitrogênio líquido para eppendorf contendo 1 mL de meio de manutenção suplementado com solução de sacarose 0,15

M sacarose e 1% de soro fetal bovino (SFB), encostando a extremidade contendo o embrião no topo da coluna de meio. Os embriões permaneceram por 6 minutos na solução, e percorreram toda a coluna de meio, sendo recuperados no fundo do eppendorf. Para tanto, a partir dos 4 minutos de reaquecimento, o meio do eppendorf foi coletado do fundo (aproximadamente 100 ul, mas verificado em microscópio estereoscópico a presença de embriões após a coleta) e transferido para placa. Aos 6 minutos, os embriões foram transferidos para placa contendo solução salina tamponada (phosphate buffered saline, PBS) suplementado com 1% SFB, lavados três vezes nessa solução e transferidos para placas cobertas com óleo mineral contendo 100 ul de meio Synthetical Oviduct Fluid suplementado com aminoácidos (SOF-AA), suplementado com 1,5% SFB e armazenados em incubadora 5% CO2 em ar e alta umidade por 48 horas. Ao final do experimento, os embriões foram corados com HOECHST 33342 por 30 minutos e fotografados para contagem do número de células. Os resultados relativos à expansão (0, 2 e 4 horas após reaquecimento) foram registrados no dia do procedimento. Os resultados de eclosão de embriões foram registrados 24 e 48 horas após o reaquecimento e comparados com as taxas de embriões frescos em estádios equivalentes de desenvolvimento (d8 e d9). O número total de células em 48 horas foi comparado com o resultado obtido para embriões frescos (d9).

Experimento 2 - O aquecimento foi realizado transferindo rapidamente o dispositivo de vitrificação do nitrogênio líquido para palhetas preenchidas com uma coluna de meio de manutenção suplementado com solução de sacarose 0,15 M e 1% SFB, seguida por uma coluna de PBS (Figura 1).



**Figura 1.** Palheta montada para o reaquecimento de embriões pelo método Embrapa VD. I. Palheta de 0,25mL acoplada a ponteira e seringa para carregar as soluções (acima) e desacoplada (abaixo), contendo coluna de PBS, coluna de ar, e coluna de meio de reaquecimento. II. Etapa de transferência do aparato de vitrificação contendo o embrião para a palheta de reaquecimento.

Os embriões permaneceram por 6 minutos na palheta, pré-aquecida a 38,5 °C. Nos primeiros 2 minutos, foram mantidos em posição vertical; após este período, as palhetas foram montadas na seringa de transferência de embriões e esses foram alocados no corpo lúteo do corno uterino ipsilateral de receptoras previamente sincronizadas, transcorridos 6 minutos do início do reaquecimento. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a transferência dos embriões por palpação transretal e as taxas de nascimento foram analisadas 30 dias após a previsão de parto. Prenhezess positivas que não resultaram em nascimentos foram consideradas perdas gestacionais. As taxas de prenhez e perdas embrionárias do grupo Embrapa VD foram comparadas com as dos embriões frescos.

**Transferência de embriões para receptoras**

Para a transferência de embriões, realizada no Campo Experimental de Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, o estro das receptoras foi previamente sincronizado pela aplicação de Cloprostenol (5 mg, Ourofino) e observação de cio. Fêmeas mestiças Holandês/Gir receberam embriões sete a oito dias após manifestação de sinais de estro, confirmada a presença de corpo lúteo. A transferência do embrião foi realizada após anestesia epidural com 3 mL

- 4 mL de lidocaína 1% e higienização vaginal do animal, com auxílio de aplicador para transferência de embriões.

**Análise estatística**

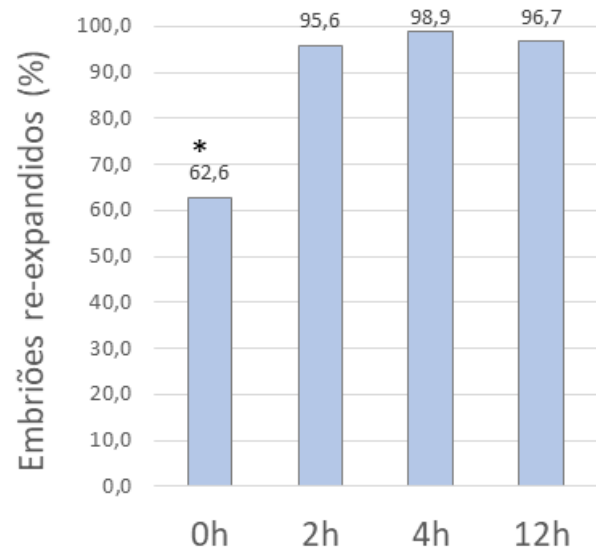
As taxas de reexpansão de embriões Embrapa VD (comparadas entre momentos); eclosão, prenhez, nascimento e perdas gestacionais (comparadas com grupo Fresco) foram analisadas pelo teste exato de Fisher. O número de células encontrado nos embriões 48 horas após o cultivo foi comparado com o grupo fresco pelo Teste T. As análises foram realizadas no aplicativo GraphPad, adotando o nível de significância de 5%.

**Resultados e discussão**

**Experimento 1 - Avaliação in vitro**

Foram analisados por 48 horas o desenvolvimento in vitro de 91 embriões Embrapa VD após o reaquecimento e de 35 embriões frescos, tidos como controle, obtidos em duas replicatas.

Na Figura 2, podemos observar as taxas de reexpansão obtidas para os embriões Embrapa VD reaquecidos, no momento do reaquecimento (logo após a retirada da solução de sacarose, 0 hora), e após 2 horas, 4 horas e 12 horas.



**Figura 2.** Reexpansão in vitro de embriões vitrificados e reaquecidos pelo método Embrapa VD. Embriões foram cultivados após a vitrificação e reaquecimento, e o percentual de re-expandidos é mostrado no momento do reaquecimento (0 hora), 2 horas, 4 horas e 12 horas após o cultivo.

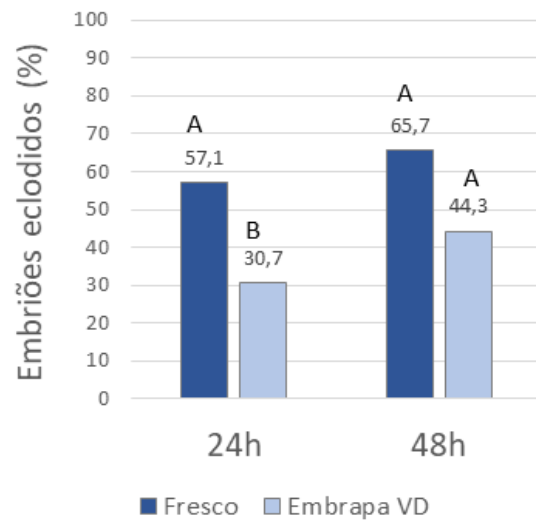
Asteriscos denotam diferença entre o momento identificado e os demais (p<0.05).

É importante observar que, no momento do reaquecimento, apenas 62,6% dos embriões estão reexpandidos, percentual que sobe para 95,6% após 2 horas e se mantém nos próximos momentos avaliados. Esta observação é importante por dois aspectos: Primeiramente, notamos que a avaliação logo após o reaquecimento (0 hora) não reflete o potencial dos embriões, pois mesmo os não reexpandidos puderam reexpandir nas horas seguintes em que foram avaliados. O outro aspecto relevante é que o percentual de embriões Embrapa VD reexpandidos é próximo a 100%, indicando que a quantidade de embriões que são perdidos e seriam descartados ao invés de transferidos é muito baixa.

Assim, a técnica Embrapa VD se mostrou adequada para permitir a transferência dos embriões sem a realização de intervenções laboratoriais (transferência direta).

Na medicina humana, as taxas de reexpansão normalmente são maiores que 95%, similares às obtidas no processo Embrapa VD, e o tempo de reorganização da blastocela e reexpansão varia de embrião para embrião, podendo ser mais longo em alguns casos (Schiewe; Anderson, 2017).

Na Figura 3, observam-se as taxas de eclosão obtidas para os embriões Embrapa VD reaquecidos, em comparação com embriões frescos no mesmo estágio de desenvolvimento. Nota-se que os percentuais de eclosão de embriões frescos não aumentam de forma significativa de 24 horas para 48 horas, ao contrário do que ocorre com os embriões Embrapa VD, que apresentam percentual maior ( $p < 0,05$ ) de eclodidos nas 48 horas. Na avaliação de 24 horas, comparando os grupos, percebemos que os percentuais de eclodidos são menores nos embriões Embrapa VD do que nos frescos. Entretanto, na avaliação de 48 horas o percentual de eclosão é similar entre embriões Embrapa VD e frescos.

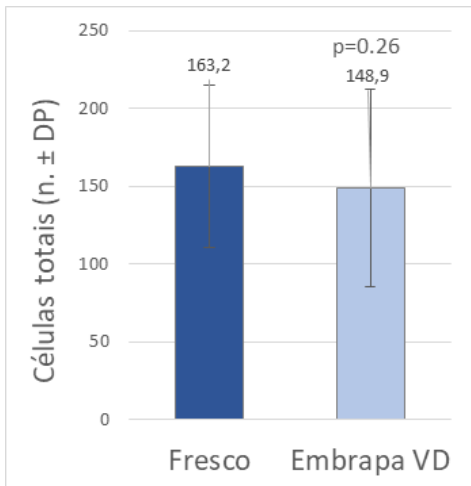


**Figura 3.** Eclosão in vitro de embriões vitrificados e reaquecidos pelo método Embrapa VD em comparação a embriões frescos. Embriões foram cultivados após a vitrificação e reaquecimento, paralelamente a embriões frescos. O percentual de eclodidos é mostrado 24 horas (d8 nos frescos) e 48 horas (d9 nos frescos) após o reaquecimento e início do cultivo.

Letras distintas denotam diferença entre grupos ( $p < 0,05$ ).

Este dado sugere um atraso na eclosão nos embriões Embrapa VD, decorrente da reorganização necessária após o procedimento de vitrificação/reaquecimento, comparados aos embriões frescos. Porém, aparentemente os embriões mostram-se aptos para eclodir e seu comportamento se assemelha àqueles frescos já em 48 horas de cultivo (equivalente ao d9 de desenvolvimento).

Por último, na Figura 4 comparamos o número de células presente em embriões Embrapa VD reaquecidos, em comparação com embriões frescos no mesmo estágio de desenvolvimento, ao final das 48 horas de cultivo in vitro (equivalente ao d9 de desenvolvimento pós FIV). Não observamos diferença estatística entre o número de células de embriões Embrapa VD e frescos, o que sugere potencial de desenvolvimento similar no d9.



**Figura 4.** Número total de células após 48 horas de cultivo in vitro de embriões vitrificados e reaquescidos pelo método Embrapa VD em comparação a embriões frescos. Embriões foram cultivados após a vitrificação e reaquescimento, paralelamente a embriões frescos. O número de células é mostrado 48 horas (d9 nos frescos) após o reaquescimento e início do cultivo.

O p resultado da comparação estatística entre grupos está apresentado no gráfico. resultado da comparação estatística entre grupos está apresentado no gráfico.

### Experimento 2 - Avaliação in vivo

Durante estação de monta, transferimos para receptoras 174 embriões, sendo 93 frescos e 81 vitrificados e reaquescidos pelo método Embrapa VD. Na Figura 5, observamos as taxas obtidas após as transferências.

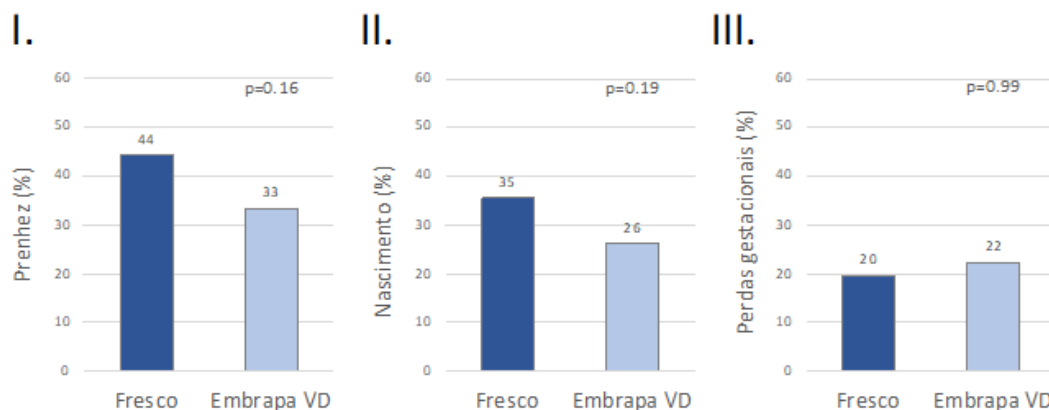
Não há diferença estatística nas taxas de prenhez (Figura 5.I), nascimento (Figura 5.II) ou perdas gestacionais (Figura 5.III) comparando embriões frescos a embriões Embrapa VD.

Os resultados alcançados neste e em outros trabalhos da equipe com a técnica Embrapa VD (Oliveira et al., 2020) permitem considerar a técnica validada em ambiente laboratorial (escala de maturidade tecnológica – Manufacturing Readiness Levels - MRL4), prototipada e escalonada em ambiente relevante de produção (MRL5 e 6). Nas próximas etapas, a tecnologia será validada em ambiente operacional com escala final, para permitir a qualificação do processo agropecuário e a transferência da tecnologia ao setor produtivo.

Porém, já é possível perceber o potencial inovador da tecnologia, pois as vantagens da vitrificação associada à transferência direta são inúmeras. Entre elas, podemos citar a logística facilitada de comercialização destes embriões em palhetas, dentro de botijões de nitrogênio líquido; a introdução integral da genética desejada, superior à obtida na inseminação artificial, que introduz apenas cerca de 50% da genética ao embrião produzido; o estabelecimento de protocolos sanitários aprimorados pela prevenção da introdução de receptoras no rebanho, que representam possíveis veículos de patógenos; e a redução do uso de hormônios na propriedade com a possibilidade de uso do cio natural.

Cabe ressaltar que o objetivo deste documento não é comparar a técnica Embrapa VD com outras técnicas de congelamento, incluindo protocolos já estabelecidos a partir da metodologia de congelamento lento, mas, sim, propor um novo método de reaquescimento, o Processo Embrapa VD, que permita avanço no uso da criopreservação para sistemas comerciais.

A vitrificação é uma técnica que possibilita maior potencial de desenvolvimento aos embriões criopreservados do que metodologias de congelamento



**Figura 5.** Resultados das gestações obtidas após transferência para receptoras de embriões vitrificados e reaquescidos pelo método Embrapa VD em comparação a embriões frescos. I, II, III. Taxa de prenhez (I), nascimento (II) e percentual de perdas gestacionais (III) é mostrado nos gráficos.

O p resultado da comparação estatística entre grupos está apresentado no gráfico gráfico.

lenta, e por isso seu uso em substituição das técnicas convencionais é recomendado (Li et al., 2014; Rienzi et al., 2017). O gargalo para adoção da vitrificação em escala comercial para embriões bovinos é o reaquecimento, que pretendemos solucionar com a técnica Embrapa VD e seus desdobramentos.

## Conclusões

1. Embriões bovinos vitrificados e reaquecidos pela metodologia Embrapa VD apresentam baixo índice de não-reexpansão (3%), quando comparados aos resultados usualmente obtidos (17 a 30%) na metodologia tradicional de vitrificação/reaquecimento (Oliveira et al., 2020, 2022), e a qualidade dos embriões é similar àquela de embriões frescos, em ambiente laboratorial.

2. Taxas de gestação e perdas embrionárias similares às obtidas a partir de embriões frescos foram obtidas com o uso da tecnologia Embrapa VD em Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite.

## Agradecimentos

À Embrapa (SEG 12.13.06.020.00.04) pelo apoio financeiro.

## Referências

- LI, Z.; WANG, Y. A.; LEDGER, W.; EDGAR, D. H.; SULLIVAN, E. A. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. **Human Reproduction**, v. 29, n. 12, p. 2794-2801, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deu246>.
- OLIVEIRA, C. S.; FEUCHARD, V. L. da S.; FREITAS, C. de; ROSA, P. M. da S.; CAMARGO, A. J. dos 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>.
- OLIVEIRA, C. S.; FEUCHARD, V. L. da S.; MARQUES, S. C. de S.; SARAIVA, N. Z. Modulation of lipid metabolism through multiple pathways during oocyte maturation and embryoculture in bovine. **Zygote**, v. 30, n. 2, p. 258-266, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199421000629>.
- OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; CAMARGO, A. J. dos R.; FREITAS, C. de; IGUMA, L. T.; CARVALHO, B. C. de; CAMARGO, L. S. de A.; OLIVEIRA, L. Z.; VERNEQUE, R. da S. Oocyte origin affects the in vitro embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*) - Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 209, article 106165, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106165>.
- 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>.
- SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; COLOMBO PEREIRA, M. H.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-1151, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.029>.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1-19, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0236>.
- SCHIEWE, M.; ANDERSON, R. Vitrification: the pioneering past to current trends and perspectives of cryopreserving human embryos, gametes and reproductive tissue. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, v. 2017, p. 57-68, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2147/bsam.s139376>.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199809\)51:1%3C53::aid-mrd6%3E3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199809)51:1%3C53::aid-mrd6%3E3.0.co;2-v).
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 476-481, 2017. Edição dos proceedings do 31º Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, Cabo de Santo Agostinho, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR989>.