PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: ESTADO DA ARTE

Roberta Reis Silva^{1,4}, Valcinir Aloísio Scalla Vulcani¹, Aline Sousa Camargos², Uadila Rabelo da Costa³, Mateus Monteiro Dutra¹, José Renato Chiari⁴

¹ Universidade Federal de Goiânia, Departamento de Medicina Veterinária, Jataí, GO; ² Instituto Federal Goiano, Departamento de Zootecnia, Morrinhos, GO; ³ FESURV, Departamento de Medicina Veterinária, Rio Verde, GO; ⁴ Samvet embriões, Morrinhos, GO – E-mail: samvetembrioes@hotmail.com

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia caracterizada pela recuperação (OPU) e maturação (MIV) dos oócitos selecionados de doadoras previamente escolhidas. Em seguida realiza-se a fertilização dos oócitos maturados (FIV), cultivo (CIV) dos embriões produzidos para transferência (TE) em receptoras ou criopreservação destes embriões. As técnicas de criopreservação consistem em estocar o material biológico em nitrogênio líquido. Essas técnicas conduzem as células a um estado de dormência metabólica e, portanto, o material mantém-se estável por maior tempo. Sendo assim, garante que quando forem reaquecidos irão manter suas características e estarão aptos para transferência, obtendo uma taxa de prenhez similar a daqueles embriões transferidos a fresco. A demanda por carnes premium e o mercado lácteo estão cada vez mais exigentes, requerendo uma maior eficiência na produção, fator este que tem intensificado o uso dessas biotecnologias tanto para os criadores de gado de corte, quanto para os produtores de leite. Portanto, a fertilização *in vitro* aumenta a produção de fêmeas em rebanhos leiteiros e contribui para o ganho expressivo da produtividade e garante a obtenção de prenhez de baixo custo em rebanhos comerciais de corte. Portanto, a PIV atua ainda, nos rebanhos aliando maior lucratividade, qualidade e produtividade.

Palavras-chave: Biotecnologia, congelamento lento, fertilização *in vitro*, fertilização, vitrificação

CATTLE *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION: STATE OF ART

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a biotechnology characterized by recovery (OPU) and maturation (IVM) of selected oocytes from previously chosen donors. Fertilization of mature oocytes (IVF), culture (IVC) of the embryos produced for transfer (ET) in receptors or cryopreservation of these embryos is then carried out. The cryopreservation techniques consist of storing the biological material in liquid nitrogen. These techniques drive the cells to a state of metabolic numbness, and therefore, the material remains stable for a longer time. Thus, it guarantees that when reheated they will maintain their characteristics and be able to transfer, obtaining a pregnancy rate similar to those of embryos transferred fresh. The demand for premium meats and the dairy market are increasingly demanding, requiring greater efficiency in production, a factor that has intensified the use of these biotechnologies for both beef cattle and dairy farmers. Therefore, *in vitro* fertilization increases the production of females in dairy herds and contributes to the expressive gain of productivity and guarantees the achievement of low cost pregnancy in commercial cutting herds. Therefore, the PIV still acts in the herds combining greater profitability, quality and productivity.

Keywords: biotechnology, slow freezing, *in vitro* fertilization, fertilization, vitrification

INTRODUÇÃO

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião (SBTE), em 2009, o Brasil consolidou sua liderança no mercado de embriões PIV, respondendo por mais de 85% do total mundial (SBTE, 2009). O país se destaca devido ao fato das fêmeas *Bos taurus indicus* produzirem dezenas de oócitos em um único procedimento de aspiração folicular em relação direta à produção de folículos (PONTES et al., 2009).

Algumas das principais diferenças da fisiologia observada entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* estão relacionadas a duração do estro, intervalo de início do estro-ovulação, número de ondas de crescimento folicular, dia da divergência folicular, diâmetro do folículo dominante, diâmetro do folículo ovulatório, diâmetro do corpo lúteo. (BARUSELLI et al., 2007).

Também de acordo com a SBTE (2009), durante o período de 2002 a 2006 houve uma estabilização desse mercado após intenso crescimento. Dentre os motivos de tal acontecimento estava a dificuldade da criopreservação de embriões oriundos de PIV, quando comparado à criopreservação de embriões produzidos *in vivo*. Esta limitação, apresenta-se cada vez menor nos dias atuais, mas ainda é evidente na PIV (PENITENTE FILHO et al., 2013).

No entanto, no Brasil, apenas 5-7% dos embriões de PIV produzidos são criopreservados e transferidos (VIANA, 2012). Com a utilização desta biotécnica de criopreservação torna-se possível estocar embriões excedentes, podendo aproveitar o estro natural das receptoras, e diminuindo assim custos com protocolos, e podendo, também, controlar a época de parição das receptoras (SIQUEIRA FILHO, 2009; SANTIN et al., 2009).

Para criopreservação de embriões produzidos *in vitro* novas técnicas ainda vêm sendo estudadas para que seja achado o melhor protocolo para obtenção de boas taxas de prenhez (SANTIN et al., 2009). Essa maior sensibilidade a criopreservação dos embriões de PIV deve-se ao fato de uma série de diferenças entre eles e àqueles produzidos *in vivo* como por exemplo maior conteúdo lipídico (LONERGAN et al., 2001); zona pelúcida mais frágil e maior quantidade de vacúolos (CROSIER et al., 2001), disco embrionário geralmente menor (SIQUEIRA FILHO, 2009), junções incompletas entre células do trofoblasto e botão embrionário (SIQUEIRA FILHO, 2009) e decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras (FARIN et al., 2004).

Diante disso, as pesquisas na área de criopreservação incluem estudos sobre o tempo de pré-equilíbrio, o tipo e a concentração do crioprotetor, velocidade de resfriamento, temperatura de imersão em nitrogênio líquido, velocidade de aquecimento e o método de remoção do crioprotetor, o que se procura é ajustar todos esses itens para que haja resultados de prenhez satisfatórios com o uso de embriões produzidos *in vitro* congelados ou vitrificados, bem como os transferidos a fresco (PYLES, 2003).

Desse modo, para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* existem duas técnicas que podem ser utilizadas: o método de congelamento lento, e a vitrificação (SERAPIÃO et al., 2005). As principais diferenças entre esses dois métodos estão na taxa de resfriamento e quantidade de crioprotetor utilizada (VATJA & KUWAYAMA, 2006). No primeiro, as células são expostas a baixas quantidades de crioprotetores e com menor taxa de resfriamento (BOITÉ, 2008). Enquanto que no segundo método, as células são expostas a altas concentrações de crioprotetores, havendo uma grande preocupação com o efeito tóxico desses crioprotetores, e a altas taxas de resfriamento (DALCIN & LUCCI, 2010).

De acordo com RUBIN (2010), a PIV é atualmente uma biotécnica já consolidada, com expressivo número de animais nascidos por esse procedimento. Neste contexto, este trabalho tem por objetivo realizar uma revisão de literatura acerca da produção *in vitro* de embriões bovinos.

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* (PIV)

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas a reprodução animal vêm sendo

desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva. Maximizando a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes, em um curto período de tempo (RENESTO e COELHO, 2004).

Portanto, se trata de uma técnica que exige alto investimento financeiro, e para que se obtenha melhores resultados é essencial que sejam minimizadas as perdas. Contudo, são necessários procedimentos realizados tanto a campo como no laboratório que são imprescindíveis para maximizar os resultados. Os procedimentos são: avaliação de receptoras, avaliação de doadoras, aspiração folicular (Ovum Pick Up – OPU), maturação *in vitro*, fertilização *in vitro*, cultivo *in vitro*, transferência de embriões ou criopreservação, diagnóstico precoce de gestação e sexagem fetal. (GOUVEIA, 2011).

ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU)

As doadoras são avaliadas por meio de exame ultrassonográfico dos ovários onde se qualificam os folículos para então agendar a aspiração ou iniciar um protocolo hormonal se necessário. Essas doadoras também devem ser selecionadas, sendo observadas como melhoradoras de genética, objetivando o sucesso do processo, uma vez que a qualidade dos oócitos é um dos pontos de estrangulamento da PIV (GOUVEIA, 2011).

Uma das vantagens da aspiração guiada por ultrassonografia está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para recuperação dos oócitos (BUENO & BELTRAN, 2008).

No momento da aspiração faz-se necessário uma higienização da vulva da doadora, com água, sabão neutro e secar com papel toalha, para evitar contaminações. Para que não ocorram traumas ao animal, e movimentos peristálticos durante a manipulação, recomenda-se realização de anestesia epidural utilizando lidocaína 2%, aplicando em média 3 a 6 ml na articulação sacro caudal (LEIVAS, 2006).

O procedimento de OPU é realizado com uma agulha 18G acopladas a uma linha de aspiração e bomba de vácuo, ajustadas em uma pressão de mais ou menos 76 mmHg, com vazão de 15 ml de meio por minuto, guiado por ultrassom com transdutor micro convexo conectado a uma guia de biópsia, que é inserida até o fundo vaginal (LEIVAS, 2006) (Figura 1).

Figura 1. Em A, uma visão geral dos equipamentos, do brete e contenção durante a aspiração folicular. Em B, uma aproximação demonstrando o posicionamento ideal para aspiração.

LAVAGEM E SELEÇÃO DOS OÓCITOS

O conteúdo aspirado é transferido para um filtro coletor para FIV WTA, e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração (DPBS aquecido a 38°C). O processo de lavagem é realizado colocando-se DPBS no filtro, e posteriormente depositando o material aspirado na parede do

mesmo em contato direto com o DPBS, para que os oócitos não fiquem presos na tela do fundo do filtro. Desta forma libera-se a mangueira lentamente para que toda sujidade e excesso de líquido seja descartado, restando apenas os oócitos e uma pequena quantidade de líquido, o mais límpido possível, para facilitar a seleção. O sedimento restante no filtro é colocado em placas de Petri e em seguida observado através de estereomicroscópio (lupa) para a busca, onde então são depositados em uma gota de meio “lavagem” e após uma varredura completa na placa de Petri, faz-se uma nova gota de lavagem e passa-se novamente os oócitos para esta gota, onde será realizada a contagem e posterior classificação da qualidade dos oócitos. Esse procedimento tem por objetivo deixar os oócitos sem sujidades, que possam prejudicar sua maturação. Os oócitos serão então transferidos para tubos falcon de Poliestireno contendo meio de maturação e óleo, identificados com o número da doadora e a quantidade de oócitos. Lembrando que todos materiais utilizados para lavagem e seleção são previamente esterilizados (RENESTO & COELHO, 2004).

O oócito dentro do folículo está recoberto de células da granulosa, que formam o complexo cumulus oocitário (CCO). Portanto, os oócitos produzem substâncias reguladoras com importante função na atividade das células do cumulus e os componentes dessas células participam ativamente no mecanismo de crescimento e maturação oocitário (GONÇALVES et al, 2007).

A classificação dos oócitos é descrita da seguinte maneira, seguindo a metodologia de acordo com Gonçalves (2007):

- Viáveis: oócitos com citoplasma homogêneo coberto por uma camada completa ou mais camadas de células do cumulus divididos em grau I, grau II, grau III – diferidos pelo número de camadas de células do cumulus - (Figura 2).
- Desnudo: oócito com citoplasma homogêneo coberto por uma camada incompleta ou ausente de células do cumulus.
- Degenerado: oócito com citoplasma heterogêneo, independentemente do número de camadas de células do cumulus.
- Atrésico: oócito com células do cumulus já expandidas.

Figura 2. Imagem mostrando a classificação dos oócitos viáveis aspirados e destinados a FIV. Em A, oócitos de Grau I. Em B, oócitos Grau II. Em C, oócitos Grau III

TRANSPORTE DOS OÓCITOS

Após o processo de lavagem e seleção os oócitos, esses são colocados em tubos de Poliestireno contendo meio de maturação (TMC 199 Bicarbonato, suplementado com SFB, hCG, estradiol, piruvato e amicacina) em atmosfera de 5% de CO₂ e 5% de O₂. Os tubos contendo os oócitos são vedados com rolhas e transportados em uma transportadora (TO-WTA) de oócitos a temperatura média de 36°C (RENESTO & COELHO, 2004).

MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

A maturação é essencial no processo de PIV, pois é quando o oócito adquire capacidade para ser fecundado posteriormente. Portanto, a maturação dos ovócitos depende da eficiência do método de coleta e, principalmente, dos meios e métodos de maturação *in vitro* (PALMA et al., 2001).

Quando os oócitos são retirados de folículos terciários e cultivados *in vitro*, a maturação ocorre tanto no núcleo quanto no citoplasma. A maturação do oócito está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto para ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente normal (PALMA et al., 2001).

A primeira modificação visível do núcleo é a condensação da cromatina e a dissolução da membrana nuclear, processo conhecido como ruptura da vesícula germinativa (PALMA et al., 2001). *In vivo*, esse processo tem início com o pico pré-ovulatório de LH e, *in vitro*, com a simples retirada do oócito do folículo (GONÇALVES et al., 2002).

Ao chegar ao laboratório os oócitos são transferidos para placas de Petri, em microgotas de 100 µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral. Os oócitos permanecem incubados a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada em estufa até completarem 22 a 26 horas do início da maturação. (GOUVEIA, 2011).

CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E SELEÇÃO

Os mecanismos de capacitação são poucos conhecidos, entretanto sabe-se que não ocorrem modificações morfológicas, apenas bioquímicas e estruturais que levam a eliminação de componentes decapacitantes aderidos à membrana do espermatozoide oriundos do plasma seminal, modificação da composição lipídica da membrana plasmática que fazem a hiperativação espermática, aumento da permeabilidade aos íons de Ca²⁺, modificação do pH interno e um incremento na permeabilidade e no metabolismo celular (PALMA et al., 2001).

Todas estas modificações levam a reação acrossômica que ocorre na presença de cálcio extracelular, e é a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrosso, ocorre após ligação com a zona pelúcida, e tem função de dissolução da camada glicoproteica do oócito e penetração na zona pelúcida, cuja ativação prematura é evitada pelos mesmos fatores que regulam a capacitação (PALMA et al., 2001). Para capacitação *in vitro* emprega-se a heparina, a qual desencadeia a capacitação seguida da reação acrossômica, desencadeando a formação vesículas e exposição da membrana interna (PALMA et al., 2001).

Segundo GONÇALVES et al. (2001), a adição de PHE (Penicilamina, hipotaurina, epinefrina) tem a finalidade de aumentar a atividade espermática e facilitar a sua penetração, incrementando os índices de fecundação.

Para capacitação e seleção espermática são utilizados um dos métodos: Percoll ou Lavagem Convencional. Essas técnicas têm a finalidade, após centrifugações, de remover os espermatozoides mortos, os crioprotetores, substâncias tóxicas e recuperar a maioria dos espermatozoides móveis sem produzir alterações espermáticas (GOUVEIA, 2011).

FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Após a maturação os oócitos são lavados em uma gota contendo meio TL e outra contendo meio FIV em seguida transferidos para uma placa Petri de 35mm contendo 5 microgotas de 100 µL de meio de fecundação cobertas com óleo mineral. O sêmen já capacitado é depositado em cada gota, ao redor dos oócitos, verificando-se a seguir a motilidade e vigor dos espermatozoides. Os oócitos permanecem na placa de FIV por um período de 18 a 24 horas, na incubadora a 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ (PERINE, 2007) e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007).

O dia da fecundação é considerado como o dia 0 (D0) da PIV. A fecundação é iniciada pela penetração do espermatozoide através das diferentes capas celulares e não celulares que rodeiam

o oócitos e culminam com a formação dos pró-núcleos. É uma reação em cascata, desencadeada pela passagem do espermatozoide pela ZP, penetração na membrana plasmática e seu alojamento no interior do citoplasma oocitário (PALMA et al., 2001).

CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Após os oócitos terem sido fecundados (24 horas depois) precisam passar pelo processo de desnudamento para remoção das células do cumulus, para isso são lavados em três gotas uma de meio TL outra de TL e SOF e a última somente SOF. Esse meio de cultivo é baseado nos fluídos do útero e do oviduto durante o início da gestação, podendo ser composto de BSA livre de ácidos graxos, meio CR2, de SFB, alanina, glicina e amicacina (ANTONIOLO, 2005).

São então transferidos para uma nova placa de Petri de 35mm contendo microgotas de 100 µL de meio de cultivo (SOF), recobertas por óleo mineral, onde permanecem por um período de 7 dias.

No terceiro dia “D3” (1ª *feeding*) é avaliada a taxa de clivagem que é a contagem de quantos zigotos desenvolveram até o estágio de quatro células, e metade do meio de cultivo de cada microgota é renovada, no quinto dia ou “D5” (2ª *feeding*) novamente metade do meio de cultivo de cada microgota é trocado. No sétimo dia “D7” então são envasados em palhetas de 250 microlitros para transferência, congelados ou vitrificados (GOUVEIA, 2011).

ENVASE

A avaliação dos embriões para serem transferidos é realizada no dia 7 (D7). Os embriões são classificados conforme o estágio de desenvolvimento, feita de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).

- Mo - Mórula: apresenta-se como uma massa de células com separação nítida entre os blastômeros, ocupando quase a totalidade do espaço perivitelino.
- Bi - Blastocisto Inicial: formação da blastocle e ocorre o início da diferenciação entre trofoblasto e botão embrionário. O embrião ocupa 70-80% do E.P.V.
- Bl - Blastocisto: evidente diferenciação entre células do trofoblasto e do botão embrionário; as células do botão embrionário estão compactas, a blastocle é proeminente e o embrião ocupa a totalidade do E.P.V.
- Bx - Blastocisto expandido: o embrião aumenta 1,5 x o seu diâmetro e a membrana pelúcida diminui em 1/3 sua espessura.
- Bn - Blastocisto eclodindo: o embrião está parcialmente livre da membrana pelúcida, com blastocle bem definida.
- Be - Blastocisto eclodido: o embrião está completamente livre da membrana pelúcida; ainda é nítida a presença da blastocle.

No D7 só serão transferidos os embriões que alcançaram pelo menos o estágio de “Bi”. Alguns embriões só alcançarão estes estágios no dia 8 ou 9, sendo estes considerados embriões de baixa qualidade (GALLI et al., 2003). Os embriões aptos são envasados em palhetas francesa finas (0,25mL) com meio H-SOF, Figura 3, (SOF tamponado e HEPES), lacrados e colocados em uma transportadora (TE 200i WTA) com temperatura por volta de 38°C até chegar as fazendas para realização da transferência.

Figura 3. Palhetas com embriões envasados

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE)

A transferência é realizada no “D7”, em receptoras previamente selecionadas, uma vez que o sucesso de todo procedimento depende da excelência desses animais, e de sua alta taxa de concepção, por isso devem apresentar boa condição corporal, nenhum tipo de patologia reprodutiva e que estejam ciclando normalmente após início do protocolo hormonal de sincronização que tem início no D0 quando as receptoras são avaliadas, verificando se estão ciclando e se estão aptas para entrar no protocolo, avaliamos se há a presença de corpo lúteo e tônus uterino. O protocolo consiste em 2,0 ml de Benzoato de Estradiol mais o implante de progesterona. No sétimo dia faz-se a aplicação da Prostaglandina (PGF2 α). E no dia nove é feita a retirada dos implantes e aplicação de 0,5 ml de ciprionato de estradiol e o ECG (200 a 300 mg dependendo da categoria animal). O dia dez é marcado pelo dia da aspiração das doadoras. No dia 11 é o dia da ovulação que coincide com o dia da FIV dentro do laboratório. No dia 18 as receptoras estão com 7 dias desde a ovulação e os embriões *in vitro* também com 7 dias. Na fazenda avaliam se as receptoras responderão ao protocolo de sincronização (geralmente 80% delas respondem), avalia-se o Corpo Lúteo (3>2>1) e Escore de condição corporal (1 a 5). Com a sincronização é possível garantir melhores resultados, (DESCÔNTEAUX et al, 2010).

A inovulação é o procedimento realizado para que o embrião seja depositado no corno ipsilateral ao corpo lúteo. Usualmente é feita pelo método transcervical em que a palheta é colocada em uma bainha estéril, em seguida no inovulador e para evitar contaminações deve ser utilizada a camisinha sanitária (GOUVEIA, 2011).

Por volta do dia 30 após a TE, é realizado o diagnóstico precoce via palpação, permitindo detectar quais receptoras ficaram prenhas, quais estão aptas para um novo protocolo de sincronização, alcançando assim um maior sucesso nas taxas de produção no menor tempo possível (DESCÔNTEAUX et al, 2010).

A sexagem fetal pode ser realizada a partir do 50º após o dia da transferência, sendo realizado normalmente por volta do 60º dia para garantir uma maior acurácia, e surge como uma nova perspectiva para o planejamento do rebanho, agregando valor ao produto final, uma vez que permite maiores concentrações de machos em rebanhos de corte ou de fêmeas para rebanhos leiteiros (WOLF E GABALDI, 2002).

CRIOPRESERVAÇÃO

As técnicas de criopreservação consistem em estocar o material biológico em nitrogênio líquido a -196°C, ou em sua fase de vapor a -150°C (SANTOS, 2001). Essas técnicas conduzem as células a um estado de dormência metabólica e, portanto, o material mantém-se estável por maior tempo (LIMA, 2011). Portanto, essa biotécnica permite ainda a criação de um banco de embriões de animais geneticamente superiores (BOITÉ, 2008). Obtido por meio do armazenamento em baixas temperaturas, induzindo à parada da atividade enzimática, do

metabolismo e da respiração celular, possibilitando a conservação de células por tempo indeterminado (DALCIN & LUCCI, 2010).

Para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* existem duas técnicas que podem ser utilizadas: o método de congelamento lento, ou também chamado método tradicional, e a vitrificação (SERAPIÃO et al., 2005). As principais diferenças entre esses dois métodos estão na taxa de resfriamento e quantidade de crioprotetor utilizada (VATJA & KUWAYAMA, 2006).

No congelamento lento, as células são expostas a baixas quantidades de crioprotetores e com menor taxa de resfriamento. Em decorrência desta menor taxa de resfriamento, a principal injúria ocorrida no processo é a formação de cristais de gelo (BOITÉ, 2008). Enquanto que na vitrificação, as células são expostas a altas concentrações de crioprotetores, havendo uma grande preocupação com o efeito tóxico desses crioprotetores, e a altas taxas de resfriamento (DALCIN & LUCCI, 2010).

Durante a criopreservação existem três pontos críticos de temperatura. O primeiro ponto crítico é a faixa de temperatura entre 15°C e -5°C, pois entre estas temperaturas a crioinjúria afeta as gotas lipídicas citoplasmáticas (em maior quantidade em embriões advindos de PIV) e os microtúbulos. As lesões nos microtúbulos, responsáveis pela divisão celular, são reversíveis, já nas gotas lipídicas não, e assim os oócitos e embriões acabam morrendo pelo rompimento da membrana celular. Entre -5 e -80°C há grande preocupação com a formação de cristais de gelo intra e extracelular e entre -50 e -150°C pode ocorrer danos de fratura da zona pelúcida ou citoplasma (VATJA e NAGY, 2006).

Todos os oócitos e embriões sofrem injúrias, sejam elas morfológicas ou funcionais. Entretanto, a extensão desses danos pode variar de acordo com o tamanho e formato da célula, a permeabilidade das membranas, qualidade do oócito ou embrião. E ainda, vai depender também do estágio em que a célula se encontra, da espécie e de sua origem - produzido *in vitro* ou *in vivo* - (VATJA & KUWAYAMA, 2006).

Células com membrana plasmática mais permeável à água e aos crioprotetores sofrem menos com injúrias ocorridas pelo efeito osmótico. Tal propriedade está diretamente correlacionada à composição da membrana plasmática, sendo os principais componentes os fosfolípidos, colesterol e proteínas. Esta composição pode ser alterada de acordo com a alimentação ou meio de cultura utilizado (SEIDEL, 2006).

Tanto no congelamento lento, como na vitrificação, é dada uma grande atenção às mudanças osmóticas que ocorrem durante o processo, as quais ocorrem como consequência do movimento da água entre o compartimento intra e extracelular, e do tipo de crioprotetor usado, uma vez que existem os intracelulares e os extracelulares (LEIBO, 2008).

O crioprotetor intracelular permitirá que haja diminuição do ponto crioscópico intracelular, através de ligações de hidrogênio feitas com as moléculas de água contida no meio intracelular, diminuindo a água livre no interior da célula e, conseqüentemente, prevenindo a formação de cristais de gelo. Já o crioprotetor extracelular levará a uma maior concentração do meio extracelular, levando à desidratação celular controlada pela retirada da água livre do meio intracelular por efeito osmótico. Não é possível afirmar qual é o melhor, pois o sucesso da utilização de cada um deles depende da concentração empregada, o tempo de exposição as substâncias crioprotetores, a velocidade de resfriamento, a temperatura de imersão no nitrogênio, o envase utilizado, a velocidade de reaquecimento e o método de remoção do crioprotetor (SANTIN et al., 2009; DALCIN & LUCCI, 2010.).

No momento do reaquecimento desses embriões, as mudanças osmóticas também são de relevância, pois ainda há alta concentração de crioprotetor no interior dessas células, sendo assim, se forem colocadas diretamente em solução isotônica, por osmose, haverá grande entrada de água, havendo um aumento repentino do volume das mesmas, levando a injúrias que podem ser irreversíveis (SIQUEIRA FILHO et al., 2009).

VITRIFICAÇÃO

A vitrificação é um processo termodinâmico, no qual um fluido incrementa sua viscosidade durante o resfriamento, adquirindo propriedades de um sólido. A diferença do que ocorre durante o congelamento, é que na vitrificação não se formam cristais e sim o fluido passa do estado líquido para o sólido, formando uma estrutura semelhante ao vidro, de onde vem a denominação da técnica (BAUTISTA & KANAGAWA, 1998).

Em condições práticas, a vitrificação consiste na imersão dos embriões em uma solução manutenção, acrescida de S1M, DMSO e EG (Etileno glicol) durante alguns minutos como demonstrado, na Figura 10, temos a placa com os meios utilizados, quando então são acondicionados em uma OPS (*Open Pulled Straw*), para posterior imersão direta em nitrogênio líquido, o que representa uma velocidade de resfriamento de, aproximadamente, 2500°C/minuto, sendo por isso necessário o emprego de soluções altamente concentradas com um ou mais crioprotetores permeáveis, os quais podem ser tóxicos para as células (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

A desvitrificação é um processo termodinâmico reverso, para o reaquecimento dos embriões anteriormente vitrificados. Consiste na retirada das palhetas do nitrogênio líquido e imersão da palheta com os embriões vitrificados em uma solução de sacarose ou conhecida como “manutenção”, para que os crioprotetores sejam eliminados, e em dez minutos os embriões estejam contraídos e íntegros, aptos para o envase imediato, e posteriormente possam ser transferidos (GOLÇALVES et al, 2001).

CONGELAMENTO LENTO

O congelamento lento é o método de criopreservação em que há equilíbrio, no qual as células são colocadas em baixas concentrações de crioprotetores (entre 1,0 e 1,5M) e com taxa de resfriamento entre 0,3 a 2°C/min (SARAGUSTY & ARAV, 2011).

Nesta metodologia é necessária a realização do “seeding” ou cristalização – é o momento em que é feito o congelamento instantâneo das colunas inferior e superior, a coluna em que está o embrião, essas colunas são formadas de meio por 50% de H-SOF e 50% Etileno 1,5 M na palheta onde o embrião foi envasado - sendo este a indução da cristalização do meio extracelular com o auxílio de uma pinça, previamente mergulhada em nitrogênio líquido, colocada em contato com a palheta. O “seeding” é necessário para se evitar um subresfriamento excessivo, o qual ocorre entre -5°C e -7°C, pois neste momento ocorre um brusco aumento da temperatura em decorrência da liberação do calor latente de fusão. Esse aumento excessivo de temperatura que seria letal para o embrião (SIQUEIRA FILHO, 2009). A imersão das palhetas em nitrogênio líquido, normalmente, ocorre a temperaturas entre -30 a -35°C (RUMPF et al., 2004).

Resumidamente, este processo inicia-se com o equilíbrio dos embriões na solução contendo crioprotetor a 20°C, por 10 a 15 min. Após, ocorre o envase e as palhetas são colocadas no aparelho congelador. Então, as palhetas são resfriadas até -6°C, momento em que deve ocorrer o “seeding”. Depois, em uma curva de congelamento com velocidade de 0,3 a 0,5°C/min, as palhetas são resfriadas até a -36°C. Após, são imersas em nitrogênio líquido (RUMPF et al., 2004).

IVB TRANSFER[®]

O *IVB transfer*[®], é um novo método de produção de embriões *in vitro*, exclusivo da In Vitro Brasil S/A, adaptado par transferência direta de embriões, desenvolvido baseado no congelamento lento e na utilização de diferentes meios durante a fertilização *in vitro* e no cultivo *in vitro* utilizando um meio denominado “C4” o qual tem sigilo ao acesso a sua composição e concentração. Neste método não existe troca de meio nos dias três e cinco (1º e 2º feed) como na metodologia convencional. Entretanto, no DT os embriões são trocados de placa no D4 e passam

para um meio “C5” que é uma derivação do C4, onde 1 mL de C5 é composto de 0,970 µl de C4, 0,020 µl de “Serum Replacement” e 0,010 de Dextrose. As estruturas permanecem neste meio até estarem prontos para o envase.

Os embriões são envasados no D7 de acordo com seu grau de desenvolvimento, em palhetas amarelas francesa finas (0,25mL) com Etileno Glicol e H-SOF, então são colocados na máquina de congelamento lento, que faz a temperatura cair lentamente. Após o término do procedimento, os embriões são guardados em botijões de nitrogênio e podem ser levados para as fazendas, onde serão descongelados no momento que houver necessidade, não sendo preciso uma equipe de laboratório para realizar o procedimento de reaquecimento diferentemente da vitrificação.

Para descongela-los basta retirar a palheta do nitrogênio, deixe 10 segundos no ar, e coloque em água a 35°C por 30 segundos, retire da água e balance a palheta para homogeneizar e então estarão prontos para transferência imediata utilizando inovulador.

Desta forma os clientes podem ter em suas fazendas o seu estoque de embriões congelados e transferi-los quando quiser, devido sua facilidade de descongelamento – similar ao descongelamento de sêmen.

Apesar de ser recente, o método tem se mostrado eficiente, com bons resultados, não ficando para trás dos resultados de embriões transferidos a fresco ou vitrificados.

CONGELAMENTO LENTO X VITRIFICAÇÃO

Fazendo-se uma breve comparação entre as técnicas utilizadas para criopreservar embriões, nota-se que no congelamento lento a principal injúria ocorrida à célula é a formação de cristais de gelo, enquanto que na vitrificação a principal preocupação é com as injúrias decorrentes da alta concentração de crioprotetor utilizada. Entretanto, danos osmóticos, danos pela concentração intracelular de eletrólitos, fraturas no embrião e alteração intracelular de organelas também podem ocorrer, principalmente na vitrificação. As moléculas de água possuem uma maior movimentação por encontrarem-se unidas por ligações fracas (pontes de hidrogênio).

Durante a realização do procedimento de congelamento lento, forma-se um estado cristalino caracterizado por um sólido organizado, no qual as moléculas estão unidas por um maior número de ligações e estas se dispõem de forma fixa e hexagonal, resultando em um afastamento das moléculas e formação de cristais. Já no processo de vitrificação, observa-se um estado de não-equilíbrio, conhecido como estado vítreo, caracterizado por um sólido amorfo em que parte das cadeias moleculares encontra-se desorganizada, permitindo certa flexibilidade entre as moléculas (CARVALHO et al., 2011).

A vantagem da vitrificação é que a mesma permite a eliminação total dessa formação de cristais de gelo e que a célula passe pela zona de perigo, entre +15° e -5°C, rapidamente, evitando-se assim problemas na membrana lipídica em decorrência da fase de transição pela qual a mesma passa nesta faixa de temperatura, na qual ocorre uma solidificação do lipídeo. Para minimizar esses riscos existentes na técnica de vitrificação, os pesquisadores têm buscado protocolos que utilizem menor concentração de crioprotetores, combinação do uso de dois ou três crioprotetores, sendo no mínimo um permeável (VATJA, 2000).

Acredita-se que futuramente a nova técnica desenvolvida, apesar de apresentar custo mais elevado, “IVB transfer[®]”, domine o mercado graças a sua praticidade no momento do descongelamento e a possibilidade de exportação desses embriões. No entanto ainda estão sendo feitos testes que comprovem sua eficácia, e estudos para que se possa aprimorar cada vez mais a técnica, visando maiores benefícios aos produtores que deixaram de perder osaios naturais em suas propriedades, e as empresas produtoras de embriões que desta forma passariam a vender o embrião ao invés de vender prenhez.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PIV é uma técnica que possibilita maior aproveitamento da fêmea e do sêmen, permitindo a utilização de reprodutores de alto valor comercial, e do sêmen sexado, reduzindo o tempo para atingir objetivos como melhorar a qualidade do rebanho e o número de animais que o integram. Ressalta-se que o aproveitamento do sêmen é otimizado em virtude da utilização de apenas uma dose para fertilização de diversos oócitos de uma ou mais fêmeas.

Não há uma expectativa de grandes modificações na forma atual de produção *in vitro* de embriões. A técnica está estabilizada e os principais desafios encontram-se em minimizar as flutuações nos resultados, padronizar os meios utilizados e ampliar o conhecimento a respeito da compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação genética durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

ANTONIOLLI, C.B. Produção in Vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária. 2005. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BAUTISTA, J.N.; KANAGAWA, H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Journal of Veterinary Research*, v. 45, p. 183-191, 1998.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.

BOITÉ, M.C. Comportamento osmótico e criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Reprodução animal)- Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção in Vitro de Embriões Bovinos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n.11, 2008.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 3, p. 236-248, 2011.

CROSIER, A.E; FARIN, P.W; DYKSTRA, M.J; ALEXANDER, J.E; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod*, v. 64, p. 1375-1385, 2001. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1375>

DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 3, p. 149-159, 2010.

DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, G. Principles and recommendations in ultrasound imaging. In: *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. USA: Willey Blackwell. 2010. 23-25p.

FARIN, C.E, FARIN, P.W, PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. E53-E62, 2004.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v. 59, p. 599-616, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: ROCA, 2001.340 p.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. p. 195-226, 2002.

GOUVEIA, F.F. A Produção in vitro de embriões bovinos. 2011. 35f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 11, n. 5, p. 608-614, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61169-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61169-8)

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, v. 69, p. 37-47, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.006>

LEIVAS, F.G. Influência da Atmosfera Gasosa e da Fonte Proteica sobre o desenvolvimento embrionário in vitro e taxa de prenhez em bovinos. 2006. Tese (Doutorado). Arquivo Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.

LIMA, D.T. Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction and Nutrition Development*, v. 41, p. 427-437, 2001. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001142>

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L. TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 418, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300046>

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Criopreservación of mammalian embryos and oocytes. *Biotechnologies Advances*, v. 14, p. 127-149, 1996. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00005-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00005-5)

PALMA, G. Producción in vitro de embriones. In: PALMA, G. Biotecnología de La Reprodución, Argentina, 1ª Ed. INTA Editora, 2001, 701p.

PENITENTE FILHO, J.M.; OLIVEIRA, F.A.; JIMENEZ, C.R.; TORRES, C.A.A. Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. Trabalho apresentado na 84ª Semana do Fazendeiro. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2013.

PERINI, A.P. Separação dos espermatozóides 'X'viáveis, de sêmen congelado, por gradient descontínuo de densidade, na Produção In Vitro de Embriões Destinados a Criopresevação. 2007. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP. São Paulo.

PONTES J.; NONATO JR, I.; SANCHES, B.; ERENO JR, J.; UVO, S.; BARREIROS, T.; OLIVEIRA, J.; HASLER, J.; SENEDA, M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p. 690-697, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.031>

PYLES, E.S.C.S. Criopreservação de embriões bovinos. 2003. Monografia (Doutorado)- Faculdade da Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

RENESTO, A.; COELHO, L.A. Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. 2004. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP. São Paulo.

ROSSI, M.; KRAUSE, A.R.T. Taxas de prenhez após transferência de embriões em tempo fixo frescos ou vitrificados em vacas lactantes sob condições de estresse térmico. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011. 27 dispositivos.

RUBIN, M.I.B.; PESSOA, G.A.; FRAGA, D.R.; VASCONCELOS, F.F.; SILVA, C.A.M. Produção in vitro de embriões e clonagem: um caminho conhecido? *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Supl n. 6, p. 77-85, 2009.

RUMPF, R.; BEM, A.R.; PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; SOUZA, R.V.; SILVA, A.E.D.F.; ZANEGA, C.A.; PEREIRA, D.C.; PIVATO, I.; MELO, L.M.; SILVEIRA, L.L. Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina [Manual]. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Criopreservação de embriões-metodologias de vitrificação. *Veterinária e Zootecnia*, v. 16, n. 4, p. 561-574, 2009.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 20, p. 60-65, 2001.

SENEDA, M.M.; SANTOS, G.M.G.; SILVA, K.C.F.; SPEGIORIN, M.R.; BLASCHI, W.; PONTES, J.H.F. Situação Atual da Aspiração Folicular e da Fecundação In Vitro. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. 2, Londrina, 2006. Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, 2006, p. 172-180.

SERAPIÃO, R.V.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; GILARDI, S.G.T.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; NOGUEIRA, L.A.G.. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 12, n. 1/3, p. 58-61, 2005. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.303>

SIQUEIRA FILHO, E. Pressão hidrostática: efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)- Universidade de Brasília, Brasília.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v. 37, p. 357–364, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00097-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00097-X)

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproduction*, v. 12, p. 779-796, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61091-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61091-7)

VATJA, G.; KUWAYAMA, M. Improving criopreservations systems. *Theriogenology*, v. 65, p. 236–244, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>

WOLF, A.; GABALDI, S.H. Acompanhamento ultrassonográfico da gestação em grandes animais II. *Ciências Agrárias e Saúde*, v. 2, n. 2, p. 79-82, 2002.