

AValiação *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DURANTE 48 HORAS APÓS VITRIFICAÇÃO: REEXPANSÃO E ECLOSÃO

Gabriela Luiza Soares Clarindo^{1*}, Dayana Silva Araújo², Rafael Monteiro dos Santos³, Luiza Emanuelle Farias da Silva¹,
Isadora Fioratto Lucas¹, Clara Slade Oliveira⁴ e Leticia Zoccolaro Oliveira⁵

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: gabrielaclarindo2009@hotmail.com

²Discente de pós graduação em Ciência animal – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

³Discente de pós graduação em Zootecnia – Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte/MG – Brasil

⁴Analista de pesquisa- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Leite, Juiz de Fora, MG - Brasil

⁵Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consolidou-se como uma das principais biotecnologias da reprodução bovina moderna, acelerando o ganho genético e permitindo o uso intensivo de fêmeas de alto mérito genético^{1,2}. Nesse contexto, a biópsia de trofotoderma (TE) tem se destacado como ferramenta essencial para seleção genômica pré-implantacional, ao preservar a massa celular interna e permitir a triagem de embriões com maior precisão^{3,4}. A vitrificação é amplamente utilizada para o armazenamento de embriões excedentes, oferecendo maior taxa de sobrevivência quando comparada ao congelamento lento^{2,5}. Contudo, embriões produzidos *in vitro* apresentam maior sensibilidade ao estresse criogênico, atribuída a diferenças na composição lipídica e à atividade mitocondrial alterada^{3,1}. Estudos recentes indicam que o acompanhamento das 24–48 h subsequentes ao reaquecimento é essencial para avaliar a viabilidade, sendo a reexpansão e a eclosão parâmetros-chave de recuperação funcional do blastocisto^{6,7}. Além disso, o intervalo entre a biópsia e a vitrificação pode afetar a competência de desenvolvimento, reforçando a importância de monitorar a cinética embrionária pós-aquecimento⁸. Apesar do uso crescente dessas técnicas, ainda há lacunas sobre seus efeitos combinados na fisiologia e criotolerância embrionária^{9,10}. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos pós-vitrificação e biópsia de trofotoderma associados ao desenvolvimento de embriões bovinos vitrificados, por meio do acompanhamento da reexpansão e eclosão nas 48 h após reaquecimento.

METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no laboratório de reprodução animal da EMBRAPA Gado de Leite, em Juiz de Fora, em três repetições independentes utilizando blastocistos bovinos grau 1, com 144–168 horas pós-inseminação. No sétimo dia de cultivo (D7), os embriões foram distribuídos em dois grupos: Biopsiado (remoção de 5–10% das células do trofotoderma por microaspiração) e Controle (não biopsiado). Imediatamente após a alocação, ambos os grupos foram vitrificados pelo protocolo VD da Embrapa² baseado em duas etapas de exposição a soluções crioprotetoras contendo DMSO, etilenoglicol e sacarose, seguidas de imersão direta em nitrogênio líquido. O reaquecimento foi realizado conforme o mesmo protocolo, com transferência direta dos dispositivos vitrificados para meio contendo sacarose a 37 °C, seguida de lavagem e incubação por 48 h em atmosfera controlada (5% CO₂, alta umidade, 38,5 °C). A reexpansão foi registrada quando a cavidade blastocelica tornou-se novamente visível, e a eclosão, quando o embrião eclodiu-se da zona pelúcida parcial ou totalmente. As avaliações ocorreram aos 0, 4, 24 e 48 h após o aquecimento, sob microscopia estereoscópica. Os dados de reexpansão e eclosão foram analisados por teste qui-quadrado, adotando-se $P < 0,05$ como nível de significância. Essa metodologia permitiu comparar o comportamento morfológico pós-aquecimento entre embriões biopsiados e não biopsiados, avaliando a influência da biópsia de trofotoderma sobre a recuperação e o desenvolvimento subsequente após a vitrificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Imediatamente após o aquecimento (0 h), observou-se maior proporção de embriões reexpandidos no grupo Biopsiado (33,8%) em comparação ao Controle (13,2%; $P = 0,005$). Após 4 horas, a reexpansão foi superior no grupo Controle (88,2%) em relação ao Biopsiado (74,3%; $P = 0,049$). Nos tempos subsequentes (24 h e 48 h), não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,25$), e as taxas de eclosão também não apresentaram variação significativa em nenhum ponto avaliado. Esses resultados indicam que a TE, quando realizada antes da vitrificação, não compromete a viabilidade embrionária e pode até favorecer a retomada inicial do desenvolvimento. A maior taxa de reexpansão observada

imediatamente após o aquecimento sugere que o colapso parcial do blastocisto provocado pela biópsia mimetiza o efeito do colapso mecânico, técnica que melhora a sobrevivência pós-vitrificação e reduz a apoptose^{11,12}. Assim, o grupo Biopsiado apresentou reexpansão mais precoce, enquanto o grupo Controle apenas iniciou esse processo mais tardiamente, alcançando taxas semelhantes nas avaliações de 24 e 48 horas (Fig. 1). Esse padrão também foi observado em outros estudos, em que houve a recuperação progressiva e completa da reexpansão, indicando que ambos os grupos mantêm plena viabilidade embrionária após o descongelamento¹³.

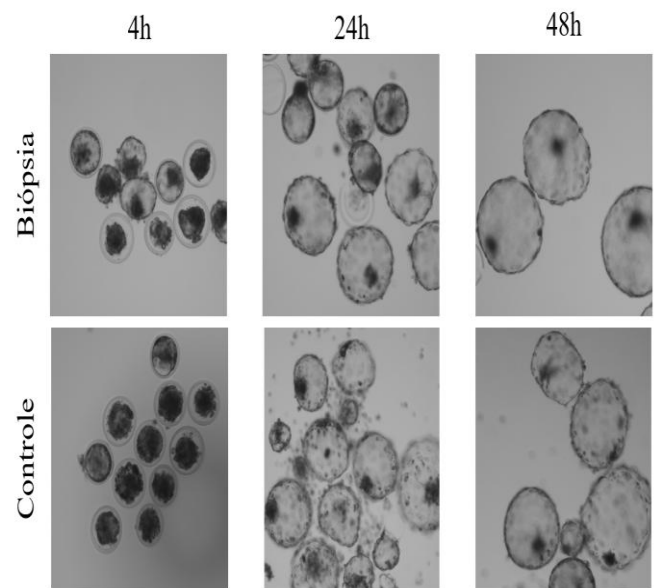


Figura 1: Reexpansão de embriões pós-vitrificação dos grupos biopsiados e controle em diferentes intervalos de tempo (4, 24 e 48 horas). Teste de Tukey, $p < 0,05$. (Fonte: Dados preliminares, 2025).

Além disso, embora as taxas de eclosão não tenham diferido estatisticamente, os valores mais altos e consistentes no grupo Biopsiado (68,9% em 24 h e 78,4% em 48 h) podem estar relacionados à perfuração prévia da zona pelúcida durante a biópsia. A vitrificação de embriões pode levar ao enrijecimento da zona pelúcida, o que dificulta o processo de eclosão embrionária¹⁴. Dessa forma, a abertura pré-existente na zona pelúcida dos embriões biopsiados pode ter facilitado a saída do embrião, antecipando e potencializando o processo de eclosão em relação ao grupo Controle, cuja zona pelúcida permaneceu intacta até o início da cultura pós-aquecimento. Assim, os dados de reexpansão e eclosão indicam que a combinação entre biópsia e vitrificação é segura e pode induzir respostas adaptativas benéficas ao desenvolvimento embrionário pós-aquecimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TE associada à vitrificação não comprometeu a criotolerância dos embriões bovinos, como demonstrado pelas elevadas taxas de reexpansão e eclosão pós-reaquecimento. Esses resultados indicam que os embriões biopsiados mantêm sua capacidade de retomada do desenvolvimento, reforçando a viabilidade da associação entre ambas as técnicas. Recomenda-se a realização de estudos futuros que explorem os mecanismos celulares envolvidos na reexpansão e eclosão, visando aprimorar o desempenho embrionário pós-vitrificação.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FEUCHARD, V. L. S.; OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z. et al. **Reactive oxygen species attenuation improves the quality of vitrified-warmed bovine embryos**. *Animal Reproduction*, v. 22, e20240035, 2025.
2. OLIVEIRA, C. S. et al. **In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle**. *Cryobiology*, v. 97, p. 222-225, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.007>. Acesso em: 1 nov. 2025.
3. PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; SCHWARZ, K. R. L. et al. **Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin**. *Theriogenology*, v. 87, p. 108-114, 2017.
4. VALENTE, R. S.; ALMEIDA, T. G.; ALVES, M. F. et al. **Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryopreservation embryonic development**. *Theriogenology*, v. 158, p. 290-296, 2020.
5. NAJAFZADEH, V.; SECHER, J.; PIHL, M. et al. **Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts**. *Theriogenology*, v. 171, p. 44-54, 2021.
6. MIKI, T.; EZOE, K.; KOURABA, S.; OHATA, K.; KATO, K. **Time from trophectoderm biopsy to vitrification affects the developmental competence of biopsied blastocysts**. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 21, n. 1, p. e12439, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12439>. Acesso em: 1 nov. 2025.
7. SOUZA, J. F.; OLIVEIRA, C. M.; LIENOU, L. L. et al. **Vitrification of bovine embryos followed by in vitro hatching and expansion**. *Zygote*, v. 26, n. 1, p. 99-103, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199417000570>. Acesso em: 1 nov. 2025.
8. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, N.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L.; RUIZ, S.; DIEZ, C.; GÓMEZ, E. **Vitrification and in-straw warming do not affect pregnancy rates of biopsied in vivo derived bovine embryos**. *Theriogenology*, v. 188, p. 49-56, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.019>. Acesso em: 1 nov. 2025.
9. AGNANI, D.; LALANI, S.; DURAN, H. E. et al. **Systematic review and meta-analysis of pregnancy outcomes after preimplantation genetic testing for aneuploidy**. *Fertility and Sterility*, v. 115, p. 402-414, 2021.
10. SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; SILVA RASCADO, T. et al. **Crucial points for the production of high-quality bovine embryos in vitro**. *Animal Reproduction*, v. 17, e20200015, 2020.
11. MIN, S. H.; LEE, E.; SON, H. H. et al. **Forced collapse of the blastocoel enhances survival of cryotop vitrified bovine hatching/hatched blastocysts derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer**. *Cryobiology*, v. 66, p. 195-199, 2013.
12. MIN, S. H.; KIM, J. W.; LEE, Y. H. et al. **Forced collapse of the blastocoel cavity improves developmental potential in cryopreserved bovine blastocysts by slow-rate freezing and vitrification**. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 684-692, 2014.
13. MARTÍNEZ-RODERO, I.; SALAS-HUETOS, A.; DIAZ-MUÑOZ, J. et al. **Blastocoel fluid aspiration improves vitrification outcomes and produces similar sexing results of in vitro-produced cattle embryos compared to microblade biopsy**. *Theriogenology*, v. 218, p. 142-152, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.042>. Acesso em: 1 nov. 2025.
14. INABA, Y.; MIYASHITA, S.; SOMFAI, T. et al. **Cryopreservation method affects DNA fragmentation in**

APOIO:

UFMG



GRAAF-BOV
Grupo de Otimização e Aproveitamento
em Fertilidade de Bovinos

Embrapa

FAPEMIG