

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS:
Boas práticas nas técnicas de vitrificação e *Direct Transfer*

Autor: Carlos José de Souza

Orientador: Prof^º. Dr. Gustavo Lage Costa

Goiânia – GO



CARLOS JOSÉ DE SOUZA



**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS:
Boas práticas nas técnicas de vitrificação e *Direct Transfer***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária, junto ao curso de Medicina Veterinária, da Escola de Ciências Médicas e da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Orientador: Prof^a. Dr. Gustavo Lage Costa

Goiânia – GO

2026

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

No dia 03/06/2026, às 17:30 horas, o(a) estudante
Carlos José de Souza,

do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, expôs, em Sessão Pública de Apresentação de Trabalho de Conclusão de Curso, o trabalho intitulado Criopreservação de embriões bovinos: Boas práticas nas técnicas de vitrificação e direct transfer

para a Banca de Avaliação composta pelos docentes,
Gustavo Lage Costa (Presidente),

Esther Silveira Borges de Moraes (Membro 1) e

Arthur Francisco Júnior (Membro 2). O

trabalho da Banca de Avaliação foi conduzido pelo (a) docente Presidente que, inicialmente, após apresentar os docentes integrantes da Comissão, concedeu 20+5 minutos ao (a) aluno (a) para que este (a) expusesse o trabalho. Após a exposição, o (a) docente Presidente concedeu a palavra a cada membro convidado da Comissão para que estes arguissem o (a) aluno. Após o encerramento das arguições, a Banca de Avaliação, reunida isoladamente, avaliou o trabalho desenvolvido e o desempenho do (a) aluno na exposição, considerada a trajetória deste (a) no desenvolvimento do TCC. Como resultado da avaliação, a Banca de Avaliação deliberou pela:

☒ Aprovação;

☐ Aprovação, condicionado às correções recomendadas pelos membros da banca;

☐ Reprovação.

Aprovação condicionada às correções recomendadas pelos membros da banca:

A Banca de Avaliação conclui que o(a) aluno está APROVADO(A) condicionado às correções de forma e/ou conteúdo recomendados. As correções deverão ser indicadas no formulário de Avaliação Final de Trabalho de Conclusão de Curso. O(A) aluno terá o prazo de 10 dias para os ajustes e entrega da versão final ao professor (a) orientador (a), contado a partir da data da sessão de apresentação pública do TCC.

Reprovação.

A Banca de Avaliação conclui que o trabalho apresentado não satisfaz as condições mínimas e o estudante está REPROVADO(A).

A Banca Avaliadora:

Membro Presidente da Banca Avaliadora: Gustavo Lage Costa
Membro Convidado da Banca Avaliadora: Esther Silveira Borges de Moraes
Membro Convidado da Banca Avaliadora: Arthur Francisco Júnior

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, fonte de toda sabedoria e força, que me sustentou em cada etapa desta jornada. À minha família, pelo apoio constante e por nunca duvidarem da minha capacidade, esta conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ser a fonte de toda sabedoria e fortaleza. Foi Ele quem sustentou meus passos nos momentos de dificuldade e quem iluminou o caminho até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Márcio Antônio de Souza e Betânia Gonçalves de Souza, que sempre foram meu maior alicerce. Cada conquista minha carrega o peso do amor, da dedicação e dos sacrifícios que fizeram por mim ao longo de toda a vida. Esta vitória é, antes de tudo, de vocês.

À minha tia Vera Lúcia Rodrigues Batista, que com carinho e presença constante sempre exerceu o papel de uma verdadeira mãe. Seu afeto e seu apoio foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, professor Gustavo Lage Costa, pela paciência, pela sabedoria compartilhada e pela confiança depositada em mim durante toda esta jornada. Dentro da vida acadêmica, foi muito mais do que um orientador, foi uma referência, um guia e, acima de tudo, uma figura paterna. Sou profundamente grato por tudo.

Ao meu irmão Marco Túlio Gonçalves de Souza e à minha namorada Gabriela Freitas Ribeiro, pelo amor, pelo incentivo diário e pela compreensão nos momentos em que precisei me dedicar inteiramente a este trabalho. A presença de vocês tornou tudo mais leve.

Aos meus primos Alfredo Sales Antonelli e Murilo Antonelli Canzian, e aos meus amigos Luccas Ricarte Alves, Luann Ricarte Alves e William Cota Ferreira dos Reis, pela amizade verdadeira, pelas risadas, pelo companheirismo e por tornarem essa caminhada muito mais bonita de ser vivida.

Ao meu amigo Gustavo Louredo, que o Protágoras me presenteou, e que se mostrou um amigo de verdade. Obrigado pela parceria e por fazer parte desta história.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade, o meu mais sincero obrigado.

RESUMO

A criopreservação de embriões bovinos é etapa fundamental dos programas modernos de transferência de embriões, permitindo o armazenamento prolongado, o transporte e a comercialização de material genético de alto valor zootécnico. Diante da posição de destaque do Brasil como maior transferidor mundial de embriões bovinos, conforme dados da *International Embryo Technology Society* (IETS, 2023), torna-se imprescindível a padronização das técnicas empregadas e a adoção de boas práticas que garantam resultados reprodutivos consistentes. Este trabalho consiste em uma revisão de literatura acerca de duas das principais técnicas de criopreservação embrionária bovina: a vitrificação (VT) e o *Direct Transfer* (DT). A vitrificação baseia-se na solidificação ultrarápida de soluções altamente concentradas de crioprotetores, atingindo taxas de resfriamento superiores a 20.000°C/min com dispositivos como a *Open Pulled Straw* (OPS) e o Cryotop, eliminando completamente a formação de cristais de gelo intracelulares e proporcionando elevadas taxas de sobrevivência embrionária, especialmente para embriões produzidos *in vitro* (PIVE). O *Direct Transfer*, por sua vez, consiste no congelamento lento de embriões em soluções de etilenoglicol (EG) em concentrações compatíveis com a inovulação direta nas receptoras após o descongelamento, dispensando etapas laboratoriais de remoção do crioprotetor e conferindo praticidade excepcional para uso em campo. A revisão abrangeu os princípios criobiológicos que fundamentam ambas as técnicas, os tipos e mecanismos de ação dos crioprotetores permeantes e não permeantes, os protocolos de vitrificação e de congelamento lento, os dispositivos disponíveis e suas taxas de resfriamento, os processos de desvitrificação e reidratação embrionária, os resultados reprodutivos reportados pela literatura científica e as boas práticas de laboratório, biossegurança, manuseio e armazenamento em nitrogênio líquido, controle de qualidade, rastreabilidade e prevenção de erros operacionais. Os resultados evidenciaram que, para embriões produzidos *in vivo*, vitrificação e DT apresentam taxas de prenhez equivalentes (54% a 69% para embriões Grau I). Para embriões PIVE, a vitrificação é biologicamente superior ao DT convencional, embora o protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD), que associa vitrificação com transferência direta, tenha demonstrado taxas de prenhez estatisticamente comparáveis às de embriões a fresco (33% vs 44%), representando avanço expressivo para a aplicação comercial em campo. Concluiu-se que ambas as técnicas são complementares e estratégicas para a biotecnologia reprodutiva bovina brasileira, sendo a

adoção de procedimentos operacionais padronizados condição indispensável para a reprodutibilidade e a excelência dos resultados.

Palavras-chave: biotecnologia reprodutiva; crioprotetores; transferência de embriões.

ABSTRACT

Bovine embryo cryopreservation is a fundamental step in modern embryo transfer programs, enabling long-term storage, transportation, and commercialization of high-value genetic material. Given Brazil's position as the world's largest bovine embryo transferor, as reported by the *International Embryo Technology Society* (IETS, 2023), standardization of techniques and adoption of best practices are essential to ensure consistent reproductive outcomes. This study consists of a literature review on two of the main bovine embryo cryopreservation techniques: vitrification and *Direct Transfer* (DT). Vitrification is based on the ultrarapid solidification of highly concentrated cryoprotectant solutions, achieving cooling rates above 20,000°C/min with devices such as the Open Pulled Straw (OPS) and Cryotop, completely preventing intracellular ice crystal formation and providing high embryo survival rates, especially for *in vitro*-produced (IVP) embryos. *Direct Transfer*, in turn, involves slow-freezing embryos in ethylene glycol (EG) solutions at concentrations compatible with direct inoculation into recipient females after thawing, eliminating laboratory cryoprotectant removal steps and providing exceptional practicality for field use. The review covered the cryobiological principles underlying both techniques, the types and mechanisms of action of permeating and non-permeating cryoprotectants, vitrification and slow-freezing protocols, available devices and their cooling rates, warming and embryo rehydration processes, reproductive outcomes reported in the scientific literature, and best practices regarding laboratory conditions, biosafety, liquid nitrogen handling and storage, quality control, traceability, and prevention of operational errors. The results showed that, for *in vivo*-produced embryos, vitrification and DT yield equivalent pregnancy rates (54% to 69% for Grade I embryos). For IVP embryos, vitrification is biologically superior to conventional DT; however, the Embrapa Vitrificação Direta (VD) protocol, which combines vitrification with *Direct Transfer*, demonstrated pregnancy rates statistically comparable to those of fresh embryos (33% vs 44%), representing a significant advance for commercial field application. It was concluded that both techniques are complementary and strategically important for Brazilian bovine reproductive biotechnology, and that the adoption of standardized operating procedures is an indispensable condition for reproducibility and excellence of results.

Keywords: cryoprotectants; embryo transfer; reproductive biotechnology.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BSA	Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CBS	Closed Pulled Straw (palheta fechada estirada)
CIV	Cultivo <i>In vitro</i>
CO₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo Cumulus-Oócito (Cumulus-Oocyte Complex)
CPA	Agente Crioprotetor (Cryoprotective Agent)
CPT	Centro de Produções Técnicas
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DPBS	Solução Salina Tamponada de Dulbecco (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
DT	<i>Direct Transfer</i> (Transferência Direta)
ECG	Gonadotrofina Coriônica Equina (Equine Chorionic Gonadotropin)
EG	Etilenoglicol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (Fibroblast Growth Factor 2)
FIV	Fecundação <i>In vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante (Follicle-Stimulating Hormone)
HSV	High Security Vitrification (Vitrificação de Alta Segurança)
IA	Inseminação Artificial
IETS	<i>International Embryo Technology Society</i> (Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões)
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (Insulin-like Growth Factor 1)
LIF	Fator Inibitório de Leucemia (Leukemia Inhibitory Factor)

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIV	Maturação <i>In vitro</i>
NL₂	Nitrogênio Líquido
OPU	Aspiração Folicular Guiada por Ultrassom (Ovum Pick-Up)
OPS	Open Pulled Straw (Palheta Aberta Estirada)
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PEG	Polietilenoglicol
PIVE	Produção <i>In vitro</i> (de embriões)
PIVE	Produção <i>In vitro</i> de Embriões
PMC	PubMed Central
POP	Procedimento Operacional Padrão
PSC	Protocolo Clássico de Superovulação
PSM	Protocolo Melhorado de Superovulação
PVP	Polivinilpirrolidona
SFB	Soro Fetal Bovino
SMS	Short Message Service (mensagem de texto)
TCM	Meio de Cultura Tissular (Tissue Culture Medium)
TE	Transferência de Embriões
TIFOI	Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
USP	Universidade de São Paulo
VD	Vitrificação direta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- 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.....	23
---	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Reprodução bovina e transferência de embriões.....	5
3.1.1 Panorama da reprodução assistida em bovinos.....	5
3.1.2 Produção e coleta de embriões bovinos	6
3.1.3 Avaliação e classificação dos embriões	8
3.2 Criopreservação de embriões bovinos	8
3.2.1 Histórico e evolução da criopreservação.....	9
3.2.2 Princípios biológicos da criopreservação.....	10
3.2.3 Crioprotetores: tipos, mecanismos de ação e toxicidade	11
3.2.4 Efeitos do resfriamento e do congelamento sobre o embrião	12
3.3 Técnica de vitrificação	14
3.3.1 Fundamentos e princípios da vitrificação	14
3.3.2 Protocolos e soluções vitrificantes	15
3.3.3 Sistemas e dispositivos de vitrificação.....	16
3.3.4 Desvitrificação e reidratação embrionária	18
3.3.5 Taxas de sobrevivência e prenhez.....	19
3.4 Técnica de <i>Direct Transfer</i>	20
3.4.1 Conceito e vantagens do <i>Direct Transfer</i>	20
3.4.2 Protocolos aplicados ao <i>Direct Transfer</i>	21
3.4.3 Compatibilidade com diferentes crioprotetores	23
3.4.4 Resultados e eficiência reprodutiva	24
3.5 Comparativo entre Vitrificação e <i>Direct Transfer</i>	25
3.5.1 Vantagens e limitações de cada técnica	25
3.5.2 Indicações práticas de uso	26
3.5.3 Custo-benefício e aplicabilidade no campo	27
3.6 Bases legais e normativas para a criopreservação e transferência de embriões bovinos no Brasil	28
3.6.1 Marco regulatório federal: Lei nº 15.021/2024.....	28
3.6.2 Registro e fiscalização dos estabelecimentos: Portaria SDA/MAPA nº 1.204/2024.....	28
3.6.3 Rastreabilidade e identificação dos embriões	29
3.6.4 Requisitos zoossanitários para importação de embriões bovinos: Instrução Normativa nº 38/2018	29
3.6.5 Fiscalização permanente e responsabilidade técnica	29
3.7 Boas práticas na criopreservação de embriões bovinos	30
3.7.1 Condições de laboratório e biossegurança	30
3.7.2 Manuseio e armazenamento em nitrogênio líquido	32
3.7.3 Controle de qualidade e rastreabilidade	33
3.7.4 Erros comuns e como evitá-los	34

4.	MANUAL TÉCNICO.....	37
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina é um dos pilares da economia agropecuária brasileira e mundial. O Brasil, detentor do maior rebanho comercial bovino do planeta, com aproximadamente 196,47 milhões de cabeças em 2021 (USDA, 2022), ocupa posição estratégica na produção global de carne e leite. Nesse contexto, as biotecnologias reprodutivas tornaram-se indispensáveis para ampliar a eficiência produtiva e genética dos rebanhos, respondendo à crescente demanda por alimentos de origem animal com qualidade e sustentabilidade.

Entre essas biotecnologias, a Transferência de Embriões (TE) destaca-se como uma das ferramentas mais poderosas para a multiplicação de genótipos superiores: por meio dela, uma única doadora de alto mérito genético pode gerar dezenas de descendentes por ano, acelerando a disseminação de características desejáveis como ganho de peso, produção leiteira e resistência a doenças (Bó, 2013; Chaves; Alves, 2023). O Brasil consolidou-se como o maior transferidor de embriões bovinos do mundo, figurando entre os principais protagonistas globais na produção e transferência de embriões produzidos *in vitro* (PIVE). Estima-se, inclusive, que o número real de transferências seja superior ao oficialmente reportado, já que o volume de bainhas comercializadas supera em mais de 119% os procedimentos registrados (IETS, 2023).

Paralelamente, a criopreservação embrionária tornou-se etapa fundamental para a logística, a comercialização e a preservação do material genético. O armazenamento a longo prazo em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) superou as limitações geográficas e temporais da transferência *a fresco*, viabilizando o transporte internacional de genótipos de alto valor e a constituição de bancos de germoplasma para a conservação de raças ameaçadas (Phillips; Jahnke, 2016; Chaves; Alves, 2023).

Historicamente, o congelamento convencional (ou lento) foi o primeiro método amplamente utilizado na rotina da TE bovina, baseado em curvas de resfriamento controladas e crioprotetores em concentrações moderadas (Leibo; Mazur, 1978; Mapletoft, 2013). Embora eficiente para embriões produzidos *in vivo*, mostrou-se limitado para os embriões PIVE, cuja composição lipídica diferenciada confere maior sensibilidade ao choque térmico (Lohuis, 1995; Mapletoft, 2013). Em resposta, desenvolveu-se a vitrificação, descrita inicialmente por Rall e Fahy (1985), que consiste na solidificação ultrarrápida de uma solução altamente concentrada de crioprotetores, impedindo a formação de cristais de gelo por transição vítrea e representando um avanço substancial na preservação da viabilidade embrionária, sobretudo dos embriões *in vitro* (Vajta; Kuwayama, 2006). O aprimoramento dos dispositivos, como as palhetas abertas

estiradas (*Open Pulled Straw*, OPS), de Vajta et al. (1997), permitiu taxas de resfriamento superiores a 20.000 °C/min com volumes mínimos de solução, seguidas por gerações posteriores como Cryotop, Cryoleaf e sistemas fechados (HSV), que conciliam eficiência e segurança sanitária (Kuwayama et al., 2005).

Em paralelo, a técnica de *Direct Transfer* (DT), desenvolvida por Leibo (1984) e aprimorada por Dochi et al. (1995), emergiu como alternativa prática para embriões produzidos in vivo. Nela, os embriões são criopreservados em palhetas convencionais com etilenoglicol em concentrações que permitem o descongelamento e a inovulação diretamente na receptora, sem etapas intermediárias de remoção do crioprotetor (Santin et al., 2009), vantagem considerável em condições de campo.

A adoção crescente dessas técnicas demanda materiais que sistematizem as boas práticas de cada metodologia, uma vez que a ausência de padronização é apontada como uma das principais causas de variabilidade nos resultados e nas taxas de prenhez obtidas em campo (FAO, 2021; Pinto, 2022). Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre as técnicas de vitrificação e *Direct Transfer* aplicadas à criopreservação de embriões bovinos, com ênfase nas boas práticas que fundamentam sua execução segura, eficiente e padronizada, comparando-as sob os aspectos técnicos, biológicos, logísticos e econômicos, a fim de subsidiar profissionais da área e o desenvolvimento de protocolos operacionais padronizados (POPs) aplicáveis à realidade brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão de literatura abrangente e aprofundada sobre as técnicas de vitrificação e *Direct Transfer* aplicadas à criopreservação de embriões bovinos, com ênfase nas boas práticas que fundamentam a execução segura, eficiente e padronizada desses procedimentos, visando subsidiar a elaboração de um manual técnico para uso profissional na área de reprodução animal bovina.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o panorama atual das biotecnologias reprodutivas bovinas, contextualizando a importância da transferência de embriões e da criopreservação embrionária para o melhoramento genético e a produtividade dos rebanhos bovinos no Brasil e no mundo.
- Apresentar os fundamentos criobiológicos que embasam os processos de criopreservação de embriões bovinos, incluindo os mecanismos de formação de cristais de gelo, o efeito solução, a recristalização e os princípios de ação dos crioprotetores permeantes e não permeantes.
- Caracterizar a técnica de vitrificação em seus aspectos históricos, técnicos e operacionais, descrevendo os principais protocolos de soluções vitrificantes, os dispositivos disponíveis (palhetas convencionais, OPS, Cryotop e sistemas fechados) e os procedimentos de desvitrificação e reidratação embrionária.
- Caracterizar a técnica de *Direct Transfer* em seus aspectos históricos, técnicos e operacionais, descrevendo os protocolos de congelamento lento com etilenoglicol, a compatibilidade com diferentes crioprotetores e os resultados reprodutivos reportados na literatura para embriões *in vivo* e *in vitro*.
- Comparar as técnicas de vitrificação e *Direct Transfer* quanto às taxas de sobrevivência e prenhez, às vantagens e limitações de cada método, às indicações práticas de uso e à relação custo-benefício no contexto da reprodução bovina em campo e em laboratório.
- Sistematizar as boas práticas aplicáveis à criopreservação de embriões bovinos, abrangendo as condições adequadas de laboratório e biossegurança, o manuseio e armazenamento corretos em nitrogênio líquido, os procedimentos de controle de qualidade e rastreabilidade,

e a identificação dos erros técnicos mais comuns com suas respectivas estratégias de prevenção.

- Fornecer embasamento científico e técnico atualizado para a elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) voltados à execução da criopreservação de embriões bovinos por vitrificação e *Direct Transfer* em condições de campo e de laboratório.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Reprodução bovina e transferência de embriões

3.1.1 Panorama da reprodução assistida em bovinos

A reprodução assistida em bovinos compreende um conjunto de biotecnologias desenvolvidas ao longo do século XX e aprimoradas progressivamente até os dias atuais. Essas tecnologias têm como objetivo central ampliar o potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores, reduzir o intervalo entre gerações e acelerar o progresso genético nos rebanhos. Podem ser classificadas em quatro gerações distintas, cada uma representando um salto qualitativo em relação à anterior (Rodrigues; Bertolini, 2019).

A primeira geração é representada pela Inseminação Artificial (IA), técnica demonstrada como efetiva pelo biólogo Lazzaro Spallanzani no século XVIII e aperfeiçoada para aplicação prática na pecuária pelo russo Ivanoff no início do século XX. A IA possibilita que um único reprodutor de alto mérito genético seja capaz de fecundar centenas de fêmeas por ano, por meio da coleta, processamento e criopreservação do sêmen, permitindo sua distribuição ao redor do mundo. No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 2021, 73,4% dos municípios brasileiros já utilizavam alguma forma de inseminação artificial em bovinos de corte ou leite (Rodrigues; Bertolini, 2019).

A segunda geração é representada pela Transferência de Embriões (TE), técnica comercialmente estabelecida a partir da década de 1970. O primeiro bezerro nascido a partir de transferência de embriões foi no ano de 1951 (Willett *et al.*, 1951 Martins *et al.*, 2004), mas foi somente com o desenvolvimento dos métodos não cirúrgicos de coleta e transferência, e com a disponibilidade da prostaglandina F2 α para sincronização, que a técnica se tornou prática o suficiente para execução a campo (Martins *et al.*, 2004). Por meio da TE, fêmeas doadoras de alto mérito genético são superovuladas e inseminadas artificialmente, e os embriões produzidos são coletados e transferidos para fêmeas receptoras de menor valor zootécnico. Enquanto na reprodução natural uma vaca produz no máximo uma cria por ano, com a TE é possível obter dezenas de descendentes por doadora no mesmo período (Rodrigues; Bertolini, 2019).

A terceira geração é representada pela Produção *In vitro* de Embriões (PIVE), tecnologia que combina a aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU, *Ovum Pick-Up*), a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. O primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nasceu em 1981, nos Estados Unidos

(Brackett *et al.*, 1982, Mello *et al.*, 2016). Em 1988, Pieterse e colaboradores descreveram a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU), tornando viável a coleta repetida de oócitos em fêmeas vivas, o que impulsionou decisivamente a aplicação comercial da PIVE (Batistela *et al.*, 2023). No Brasil, a PIVE teve início em 1990, e o país se tornou, nas décadas seguintes, o maior produtor e transferidor de embriões bovinos PIVE do mundo (Mello *et al.*, 2016; IETS, 2023).

A quarta geração de biotecnologias compreende técnicas de manipulação genética, clonagem somática e edição gênica (CRISPR-Cas9), ainda em fase de desenvolvimento e validação para aplicação comercial em larga escala. Essas tecnologias vislumbram a possibilidade de introduzir ou eliminar genes específicos antes ou após a fertilização, com potencial impacto transformador na produção animal (Rodrigues; Bertolini, 2019).

O Brasil ocupa posição de destaque mundial em todas essas biotecnologias, especialmente na PIVE e na TE. De acordo com dados do IETS (2023), o país figura consistentemente entre os líderes mundiais em inovulação embriões bovinos *in vitro*. O desenvolvimento do setor é impulsionado pela combinação de um rebanho bovino extenso, alta disponibilidade de doadoras e receptoras, clima favorável, e intensa atividade de pesquisa nas universidades e instituições nacionais, como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a Universidade de São Paulo (USP), a Universidade Estadual Paulista (UNESP), a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e outras (IETS, 2023; Pugliesi *et al.*, 2024).

3.1.2 Produção e coleta de embriões bovinos

A produção de embriões bovinos para fins de transferência pode ocorrer por duas vias principais: a produção *in vivo*, por meio de protocolos de superovulação seguidos de coleta uterina; e a produção *in vitro*, mediante aspiração folicular, fecundação e cultivo em laboratório (Mapletoft, 2013; Phillips; Jahnke, 2016; Pugliesi *et al.*, 2024).

Na produção *in vivo*, o protocolo de superovulação é o passo fundamental. A doadora recebe aplicações de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) ou de gonadotrofina coriônica equina (eCG), geralmente em associação com progestágenos e prostaglandinas, com o objetivo de estimular o desenvolvimento simultâneo de múltiplos folículos. A superovulação pode ser iniciada por dois tipos de protocolo: o Protocolo Clássico de Superovulação (PSC), que pressupõe início do tratamento hormonal entre o 8º e o 10º dia após o cio, assumindo padrão de duas ondas foliculares; e o Protocolo Melhorado de Superovulação (PSM), que garante o início

do tratamento no começo de uma nova onda folicular, assegurando desenvolvimento folicular mais uniforme e respostas superovulatórias mais previsíveis (Paixão, 2015).

Após a inseminação artificial da doadora, a coleta dos embriões é realizada entre o 6º e o 7º dia após o início do cio, por meio da técnica não cirúrgica de lavagem uterina (*flushing*). Para tal, a doadora é contida em tronco, submetida à anestesia epidural baixa com lidocaína 2% e à antisepsia perianal e vulvar. Uma sonda de dois vias (sonda de Rumpf ou Foley) é introduzida transcervicalmente até o corpo uterino ou os cornos uterinos. O balão da sonda é inflado para vedação, e o útero é perfundido com Meio de Dulbecco modificado (DPBS) pré-aquecido a 25°C, pH 7,2 e osmolaridade de 290 mOsmol, em volumes de 500 mL a 1 litro por vaca, distribuídos em duas a três lavagens (Oliveira, 2013; Rumpf *et al.*, 2000).

O líquido de coleta é filtrado em um filtro de embriões (EmCon) com malha de 75 micrômetros, transferido para uma placa de Petri e avaliado sob estereomicroscópio com aumento de 10 a 40 vezes. Os embriões e oócitos não fecundados são identificados por estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica, e transferidos para tubos com meio de manutenção até o processamento definitivo (Stringfellow; Givens, 2007).

Na produção *in vitro*, os oócitos são coletados por aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). A doadora é contida e os ovários são visualizados por ultrassonografia transretal. Utilizando uma agulha acoplada a um transdutor de ultrassom e conectada a uma bomba de vácuo, os folículos de 2 a 8 mm de diâmetro são puncionados e os oócitos aspirados. Uma doadora pode fornecer em média 8 oócitos viáveis por sessão de OPU, embora seja habitual aspirar em torno de 20 oócitos por animal (Mendonça, 2023). Os oócitos coletados passam pelas etapas de seleção morfológica do complexo cumulus-oócito (COC), maturação *in vitro* (18–24 horas a 38,5°C, 5% CO₂), fecundação *in vitro* com sêmen selecionado e capacitado, e cultivo embrionário por 7 a 9 dias até o estágio de blastocisto (Rodrigues; Bertolini, 2019).

A seleção dos oócitos imaturos para a PIVE é realizada com base na morfologia do COC, dividida em 4 classificações: Oócitos Grau I apresentam três ou mais camadas de células do cumulus íntegras e citoplasma homogêneo e são considerados de alta viabilidade. Oócitos Grau II têm duas camadas de cumulus e citoplasma ligeiramente granuloso, sendo ainda considerados viáveis. Oócitos Grau III e IV, com cumulus escasso ou ausente e citoplasma degenerado, são normalmente descartados (Mendonça, 2023). Essa seleção rigorosa é essencial para a eficiência da PIVE, pois a qualidade do oócito determina diretamente a taxa de produção de blastocistos e, em última análise, a capacidade dos embriões de sobreviver à criopreservação.

3.1.3 Avaliação e classificação dos embriões

A avaliação e classificação morfológica dos embriões é etapa imprescindível antes da transferência ou criopreservação, determinando quais estruturas possuem potencial de desenvolvimento satisfatório. O sistema de classificação internacionalmente adotado é o preconizado pela *International Embryo Technology Society* (IETS), descrito no manual de Stringfellow e Seidel (1998) e atualizado por Stringfellow e Givens (2007), que leva em consideração dois critérios principais: o estágio de desenvolvimento e a qualidade morfológica (Viana, 2009; Rumpf *et al.*, 2000).

Quanto ao estágio de desenvolvimento, os embriões coletados no 7º dia pós-cio podem ser classificados nos seguintes estágios: (1) óvulo não fecundado; (2) embrião de 2 a 12 células; (3) mórula inicial; (4) mórula compacta; (5) blastocisto inicial; (6) blastocisto; (7) blastocisto expandido; (8) blastocisto eclodido. Embriões nos estágios 3 a 7 são considerados adequados para criopreservação e transferência, sendo o blastocisto expandido (estágio 7) o estágio mais utilizado em programas de vitrificação e *Direct Transfer* por apresentar maior número de células e zona pelúcida ainda íntegra (Stringfellow; Givens, 2007; Viana, 2009).

Quanto à qualidade morfológica, os embriões são classificados em quatro graus segundo os critérios da IETS. O Grau 1 corresponde a embriões excelentes ou bons: estrutura simétrica, blastômeros uniformes e bem delimitados, com até 15% de material celular degenerado ou extrusado. O Grau 2 corresponde a embriões regulares: irregularidades leves na forma e compactação, com 15 a 25% de material extrusado, viabilidade ainda considerada aceitável. O Grau 3 indica embriões pobres: irregularidades moderadas a severas, mais de 25% de células degeneradas, viabilidade duvidosa. O Grau 4 representa estruturas mortas ou degeneradas, sem potencial de desenvolvimento (Stringfellow; Givens, 2007).

Embriões de Grau 1 e 2 são selecionados para criopreservação ou transferência direta, sendo os de Grau 1 os que consistentemente apresentam maiores taxas de prenhez. Embriões de Grau 3 podem ser transferidos a fresco para receptoras em condições reprodutivas excepcionais, mas não se recomenda sua criopreservação, dada a alta probabilidade de falha pós-descongelamento. A qualidade morfológica do embrião é, portanto, um dos principais fatores preditivos do resultado reprodutivo final, independentemente do método de criopreservação utilizado (Lopatarova *et al.*, Santin *et al.*, 2009).

3.2 Criopreservação de embriões bovinos

3.2.1 Histórico e evolução da criopreservação

A história da criopreservação de embriões de mamíferos está intimamente ligada ao avanço do conhecimento em criobiologia e ao desenvolvimento das biotecnologias reprodutivas. O marco inicial de toda a criobiologia aplicada à reprodução animal foi a descoberta de Polge e colaboradores (1949), que demonstraram acidentalmente a ação crioprotetora do glicerol sobre espermatozoides bovinos durante o congelamento, descoberta que viria a fundamentar décadas de pesquisa subsequente sobre crioprotetores (Mapletoft, 2013).

O primeiro congelamento bem-sucedido de embriões de mamíferos, especificamente de camundongos, foi realizado por Whittingham *et al.* (1972) e, em paralelo, por Wilmut e Rowson (1973). Neste mesmo ano, Wilmut e Rowson realizaram com sucesso a criopreservação de embriões ovinos, a espécie bovina seguiu-se imediatamente, com os primeiros resultados publicados por Wilmut e Rowson (1973) e a consolidação da técnica ao longo da segunda metade da década de 1970 (Dalcin; Lucci, 2010). Os primeiros protocolos baseavam-se no uso de glicerol como crioprotetor, em concentrações de 1,0 a 1,5 M, com resfriamento lento e controlado até -35°C antes da imersão final em nitrogênio líquido a -196°C .

O desenvolvimento das técnicas de criopreservação de embriões bovinos ganhou impulso considerável na virada das décadas de 1970 para 1980, acompanhando o crescimento comercial da transferência de embriões. Com o aumento de embriões excedentes provenientes das superovulações e a demanda pelo armazenamento a longo prazo de material genético bovino valioso, diversos grupos de pesquisa passaram a desenvolver e aperfeiçoar protocolos de congelamento (Ongaratto, 2009). Nesse período, o glicerol era o crioprotetor padrão, mas sua toxicidade tecidual exigia a remoção completa antes da transferência, tornando o processo laborioso e sujeito a erros (Jove, 2011).

Um avanço decisivo ocorreu com a introdução do etilenoglicol (EG) como crioprotetor alternativo ao glicerol, na década de 1980. O EG apresenta menor peso molecular, maior velocidade de permeação celular e, fundamentalmente, menor toxicidade ao trato reprodutivo da receptora em concentrações usuais, o que viabilizou o desenvolvimento do método de transferência direta (*Direct Transfer* ou *One-Step*), descrito por Leibo (1984) e aperfeiçoado por Dochi *et al.* (1995). Nesse método, o embrião é congelado em solução de EG e transferido para a receptora diretamente, sem etapa de remoção do crioprotetor, simplificando enormemente o fluxo operacional em campo (Leibo, 1984, Santin *et al.*, 2009).

Em paralelo, pesquisas sobre vitrificação tiveram início efetivo com Rall e Fahy (1985), que descreveram a sobrevivência de embriões murinos submetidos à solidificação ultrarápida em soluções altamente concentradas de crioprotetores. A partir daí, uma sequência de avanços em dispositivos e soluções permitiu que a vitrificação se tornasse aplicável a embriões bovinos: as palhetas estiradas (OPS) por Vajta *et al.* (1998), o Cryotop por Kuwayama *et al.* (2005), e, mais recentemente, o protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD), que combina vitrificação com transferência direta para embriões PIVE bovinos (Oliveira *et al.*, 2024). Atualmente, a vitrificação é a técnica de referência para embriões produzidos *in vitro*, enquanto o *Direct Transfer* permanece amplamente utilizado para embriões *in vivo* pela sua praticidade operacional.

3.2.2 Princípios biológicos da criopreservação

A criopreservação baseia-se no princípio fundamental de reduzir a atividade metabólica celular a níveis próximos de zero pela diminuição drástica da temperatura, preservando a viabilidade dos tecidos por períodos indefinidos sem que ocorra deterioração biológica relevante. Contudo, o processo de resfriamento e congelamento expõe as células a riscos biológicos severos que, se não forem adequadamente controlados, levam à morte celular (Dalcin; Lucci, 2010).

O principal risco biológico associado ao congelamento é a formação de cristais de gelo intracelulares. À medida que a temperatura diminui, a água presente nos compartimentos intracelular e extracelular tende a se solidificar, formando cristais que assumem formas e tamanhos irregulares. Esses cristais causam danos físicos diretos às membranas celulares, às organelas e ao citoesqueleto, comprometendo, muitas vezes de forma irreversível, a função e a integridade celular. Mesmo pequenos cristais, invisíveis à microscopia óptica, podem provocar lesões suficientes para impedir o desenvolvimento embrionário pós-aquecimento (Santin *et al.*, 2009).

Além dos danos mecânicos diretos, o congelamento provoca o chamado efeito solução: à medida que o gelo se forma no meio extracelular, os solutos presentes se concentram progressivamente no líquido intersticial remanescente. Esse gradiente osmótico força a saída de água do interior da célula por osmose, promovendo desidratação celular. Se o resfriamento ocorre de forma muito lenta, a desidratação é excessiva e pode causar danos osmóticos graves às proteínas de membrana e às enzimas intracelulares. Se ocorre de forma muito rápida, a água não tem tempo de sair da célula antes da solidificação, favorecendo a formação de gelo

intracelular. Esse dilema define o que os criobiologistas denominam curva de resposta bifásica ao resfriamento, que estabelece uma janela de velocidade de resfriamento ótima para cada tipo celular (Dalcin; Lucci, 2010).

O processo de reaquecimento apresenta riscos adicionais. Ao elevar a temperatura, pequenos núcleos de cristais de gelo eventualmente formados durante o congelamento podem crescer em um fenômeno denominado recristalização, causando novos danos mecânicos às estruturas celulares que já sobreviveram ao resfriamento. Por isso, o protocolo de aquecimento deve ser tão criteriosamente planejado quanto o de congelamento. A velocidade de aquecimento deve ser suficientemente rápida para minimizar a janela de temperatura em que a recristalização é mais provável, geralmente entre -130°C e -60°C (Dalcin; Lucci, 2010).

O princípio fundamental que orienta todos os protocolos modernos de criopreservação é, portanto, a substituição máxima da água intracelular por crioprotetores antes do congelamento, de modo a minimizar simultaneamente os danos osmóticos e a formação de cristais de gelo. A eficiência dessa substituição define a qualidade do processo e determina diretamente as taxas de sobrevivência e prenhez obtidas após o descongelamento (Dalcin; Lucci, 2010).

3.2.3 Crioprotetores: tipos, mecanismos de ação e toxicidade

Os crioprotetores (CPAs, *Cryoprotective Agents*) são substâncias que, ao serem incorporadas às soluções de processamento embrionário, reduzem os danos provocados pelo processo de criopreservação. São classificados em dois grandes grupos principais: crioprotetores permeantes (intracelulares) e crioprotetores não permeantes (extracelulares), que exercem mecanismos de ação complementares (Santin *et al.*, 2009; Dalcin; Lucci, 2010).

Os crioprotetores permeantes são moléculas de baixo peso molecular, capazes de atravessar a membrana plasmática e se distribuir tanto no espaço intracelular quanto no extracelular. Atuam substituindo parte da água intracelular, reduzindo o ponto de congelamento da solução e aumentando sua viscosidade, o que dificulta a nucleação e o crescimento de cristais de gelo. Os principais crioprotetores permeantes utilizados na criopreservação de embriões bovinos são o etilenoglicol (EG), o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol e a dimetilformamida (DMF). O etilenoglicol é o mais amplamente empregado: seu peso molecular de 62 g/mol confere alta velocidade de permeação celular, e sua toxicidade tecidual é menor do que a do glicerol, tornando-o compatível com o protocolo de transferência direta sem necessidade de diluição prévia (Santin *et al.*, 2009; Pyles, 2006; Jove, 2011).

O DMSO, embora muito eficaz como crioprotetor permeante, apresenta maior potencial tóxico que o EG, especialmente em altas concentrações ou longos tempos de exposição. Por isso, é frequentemente utilizado em combinação com o EG, em formulações mistas, que permitem reduzir a concentração individual de cada componente sem comprometer a eficácia crioprotetora total. A combinação EG (20%) + DMSO (20%) é uma das mais estudadas para vitrificação de embriões bovinos e está presente em inúmeros protocolos publicados na literatura (Pyles, 2006; Ramos *et al.*, 2006).

Os crioprotetores não permeantes são macromoléculas ou carboidratos que permanecem no espaço extracelular, exercendo efeito osmótico protetor. Atuam promovendo a saída controlada da água intracelular antes do congelamento e estabilizando a membrana plasmática durante o processo criogênico. Os principais crioprotetores não permeantes utilizados na criopreservação embrionária bovina são a sacarose, a trealose, a rafinose e o soro fetal bovino (SFB). A sacarose é amplamente empregada nas soluções de reidratação, em concentrações decrescentes (0,5 M $\rightarrow$ 0,25 M $\rightarrow$ 0,15 M $\rightarrow$ 0,0 M), para promover a reentrada gradual de água na célula após o aquecimento sem provocar choque osmótico reverso (Santin *et al.*, 2009).

A toxicidade dos crioprotetores constitui um dos principais desafios no desenvolvimento de protocolos eficientes de criopreservação. Todos os CPAs são, em maior ou menor grau, citotóxicos, especialmente quando utilizados em altas concentrações ou por longos períodos de exposição. A toxicidade se manifesta por alterações osmóticas, interferência no funcionamento de enzimas e proteínas estruturais, danos ao DNA nuclear e mitocondrial, e comprometimento da integridade da membrana plasmática. Para minimizar esses efeitos, os protocolos modernos preconizam exposições escalonadas e de curta duração às soluções de crioprotetor, preferencialmente realizadas em temperatura reduzida, que diminui a velocidade das reações citotóxicas (Dalcin; Lucci, 2010).

Pesquisas comparativas avaliando diferentes concentrações e combinações de crioprotetores demonstraram que não existe uma formulação universalmente ótima: a escolha deve ser feita com base no tipo de embrião (*in vivo* ou *in vitro*), no estágio de desenvolvimento, no dispositivo de vitrificação empregado e na experiência técnica do operador. Entre as formulações mais estudadas para vitrificação em OPS destacam-se: 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose; 20% EG + 20% DMF + 0,5 M sacarose; e 40% EG + 0,3 M trealose + 20% PVP (Pyles, 2006; Santin *et al.*, 2009).

3.2.4 Efeitos do resfriamento e do congelamento sobre o embrião

O embrião bovino é uma estrutura multicelular com características físicas e fisiológicas que determinam sua resposta específica ao processo de criopreservação. O estágio de desenvolvimento, a composição lipídica das células, a permeabilidade da membrana à água e aos crioprotetores, e a integridade da zona pelúcida são fatores que influenciam diretamente a sobrevivência embrionária após o congelamento (Dalcin; Lucci, 2010).

Uma das peculiaridades mais relevantes dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIVE) é seu elevado conteúdo de lipídios intracitoplasmáticos, especialmente na forma de gotículas lipídicas visíveis ao microscópio de luz, que conferem ao embrião uma coloração escura e opaca característica. Essa composição lipídica diferenciada torna os embriões PIVE particularmente sensíveis ao choque térmico (*chilling injury*), que consiste em danos celulares causados pela redução de temperatura mesmo antes do início do congelamento propriamente dito, já na faixa de 0°C a 15°C, lipídios intracelulares podem solidificar e romper membranas. Pesquisas demonstraram que embriões produzidos *in vitro* são significativamente mais sensíveis ao chilling injury do que embriões *in vivo*, o que explica a maior dificuldade histórica em criopreservar embriões PIVE com bons resultados pelo método de congelamento lento convencional (Santin *et al.*, 2009; Ramos, 2025).

A resposta do embrião ao congelamento também é influenciada pelo estágio de desenvolvimento. Mórulas compactas possuem blastômeros densamente compactados e menor espaço livre de água intracelular livre, conferindo-lhes certa resistência ao congelamento lento. Blastocistos expandidos apresentam cavidade blastocélica proeminente, cujo colapso é observado durante a criopreservação como resultado da intensa movimentação de água para o exterior da célula. Esse colapso é fisiológico e temporário: a taxa de reexpansão da blastocela nas primeiras 1 a 2 horas após o aquecimento é considerada um dos melhores indicadores práticos de viabilidade pós-criopreservação (Stringfellow; Givens, 2007; Oliveira *et al.*, 2024).

Estudos comparativos demonstraram que a velocidade de resfriamento é um parâmetro crítico para a sobrevivência embrionária. No congelamento lento, velocidades da ordem de 0,3°C/min a 0,5°C/min na região crítica de temperatura (entre -5°C e -35°C) são utilizadas, com a indução manual ou automática da nucleação do gelo (seeding) para controlar a formação de cristais extracelulares. Já na vitrificação, velocidades superiores a 20.000°C/min são atingidas com dispositivos como OPS e Cryotop, impedindo completamente a formação de qualquer cristal de gelo, tanto intra quanto extracelular (Vajta; Kuwayama, 2006; Dalcin; Lucci, 2010).

O choque osmótico é outro risco associado à criopreservação, que pode ocorrer tanto durante a adição dos crioprotetores quanto durante a sua remoção pós-aquecimento. Quando as células são expostas subitamente a soluções hiperosmóticas de crioprotetores, ocorre saída rápida de água e encolhimento celular brusco. A reentrada de água durante a reidratação também pode causar inchaço celular excessivo caso seja feita de forma abrupta. Por isso, os protocolos modernos preconizam etapas de equilíbrio gradual, com soluções de concentração crescente na adição e decrescente na remoção dos crioprotetores (Dalcin; Lucci, 2010; Jove, 2011).

3.3 Técnica de vitrificação

3.3.1 Fundamentos e princípios da vitrificação

A vitrificação é definida como o processo pelo qual uma solução líquida, suficientemente concentrada em agentes crioprotetores, se solidifica durante o resfriamento ultrarrápido assumindo um estado amorfo, denominado estado vítreo, sem a formação de qualquer cristal de gelo. Esse estado vítreo possui propriedades mecânicas de um sólido, mas mantém a desordem molecular característica de um líquido, preservando a estrutura interna das células em uma condição cineticamente paralisada sem os danos mecânicos dos cristais (Rall; Fahy, 1985; Vajta; Kuwayama, 2006).

Historicamente, o conceito de vitrificação em criobiologia foi introduzido por Luyet (1937), que propôs a possibilidade de solidificar materiais biológicos sem formação de cristais por meio de resfriamento extremamente rápido. Contudo, a aplicação prática em embriões de mamíferos só foi demonstrada de forma replicável por Rall e Fahy (1985), que vitrificaram embriões de camundongos em solução contendo dimetilsulfóxido, acetamida, propilenoglicol e polietilenoglicol. Desde então, inúmeros estudos refinaram as formulações das soluções vitrificantes e os dispositivos de vitrificação, tornando a técnica progressivamente mais segura e eficiente para diferentes espécies e tipos celulares (Rall; Fahy, 1985; Vajta; Kuwayama, 2006).

Para que a vitrificação ocorra de forma eficiente e segura, duas condições fundamentais precisam ser atendidas simultaneamente: (1) alta concentração de crioprotetores na solução, suficiente para elevar a viscosidade e reduzir o ponto de nucleação do gelo; e (2) velocidade de resfriamento extremamente elevada, que impeça o crescimento de eventuais núcleos de cristalização. Modernamente, sabe-se que a redução do volume da solução de vitrificação é

também um fator determinante: volumes abaixo de 1 μL permitem atingir taxas de resfriamento muito superiores às obtidas com maiores volumes, pois a razão entre área de superfície e volume aumenta exponencialmente com a redução do tamanho da gota (Vajta; Kuwayama, 2006; Kuwayama *et al.*, 2005).

A principal vantagem biológica da vitrificação sobre o congelamento lento reside precisamente na eliminação completa dos cristais de gelo intracelulares. Com a ausência de cristais, os danos mecânicos às membranas, organelas e citoesqueleto são drasticamente reduzidos, resultando em taxas de sobrevivência embrionária superiores, especialmente para embriões produzidos *in vitro*, que são mais suscetíveis ao chilling injury e à cristalização intracelular durante o congelamento lento (Ramos, 2025).

É importante ressaltar que, embora a vitrificação elimine os cristais intracelulares, o processo não é isento de riscos. As altas concentrações de crioprotetores utilizadas exercem toxicidade química e osmótica sobre as células. Além disso, a velocidade de reaquecimento deve ser igualmente elevada para evitar a recristalização durante o aquecimento. O sucesso da vitrificação depende, portanto, do equilíbrio preciso entre concentração crioprotetora, volume de solução, velocidade de resfriamento e velocidade de aquecimento, parâmetros que se influenciam mutuamente e que variam conforme o tipo e o estágio do embrião (Bos-Mikich, 2007).

3.3.2 Protocolos e soluções vitrificantes

Os protocolos de vitrificação para embriões bovinos envolvem, em geral, duas etapas sequenciais de exposição a soluções de crioprotetor em concentrações crescentes, seguidas de imersão imediata no nitrogênio líquido. As soluções são preparadas em meio de base (DPBS, TCM-Hepes ou similar) suplementado com proteína, habitualmente soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA), para estabilização das membranas celulares durante a manipulação (Vajta *et al.*, 1998; Stringfellow; Givens, 2007).

A primeira etapa, denominada solução de equilíbrio (SE ou SV1), objetiva a permeação parcial dos crioprotetores para o interior das células e a saída de parte da água intracelular por osmose, sem causar danos osmóticos severos. O embrião é exposto por 1 a 3 minutos a uma solução contendo concentrações moderadas de crioprotetores permeantes, tipicamente 10% de EG associado a 10% de DMSO, em meio de base com 5 a 10% de SFB. Recomenda-se que essa etapa seja realizada em temperatura de 38°C–39°C para aumentar a fluidez das membranas e a velocidade de permeação dos crioprotetores (Pyles, 2006; Santin *et al.*, 2009).

A segunda etapa, denominada solução de vitrificação (SV ou SV2), contém altas concentrações de crioprotetores permeantes, geralmente 20% de EG associado a 20% de DMSO, acrescidas de um crioprotetor não permeante como sacarose (0,5 M) ou trealose, em meio de base com SFB. A exposição do embrião à SV2 deve ser extremamente curta, tipicamente de 20 a 30 segundos, dependendo do protocolo, para minimizar os efeitos citotóxicos das altas concentrações de crioprotetores. Após esse breve período, o embrião é carregado no dispositivo de vitrificação e imerso imediatamente no nitrogênio líquido, sem qualquer demora (Pyles, 2006; Santin *et al.*, 2009; Vajta; Kuwayama, 2006).

Variações nesse protocolo bipartido são amplamente descritas na literatura. Trabalhos conduzidos por Pyles (2006) avaliaram três soluções de vitrificação distintas para embriões bovinos em OPS: (1) 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose; (2) 20% DMF + 20% EG + 0,5 M sacarose; e (3) 20% DMF + 20% DMSO + 0,5 M sacarose. Os resultados demonstraram variações nas taxas de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* entre os grupos, evidenciando que a composição da solução influencia significativamente o resultado, sendo a combinação EG+DMSO geralmente a de melhor desempenho para embriões PIVE bovinos (Pyles, 2006).

Protocolos comerciais padronizados, como os oferecidos por fabricantes como IMV Technologies, Vitrolife e Inovate (kits Rapid-I, CBS HSV e similares), disponibilizam soluções de vitrificação com composição definida e testada, permitindo reprodutibilidade de resultados entre laboratórios. Esses kits são amplamente utilizados em laboratórios de PIVE bovina no Brasil e no mundo, e seus resultados publicados permitem comparações interinstitucionais mais confiáveis do que formulações preparadas artesanalmente (Reyes, 2021).

3.3.3 Sistemas e dispositivos de vitrificação

O dispositivo de vitrificação é o suporte físico no qual o embrião é carregado antes de ser imerso no nitrogênio líquido. A escolha do dispositivo é determinante para a taxa de resfriamento alcançada e, conseqüentemente, para o sucesso da vitrificação. A evolução dos dispositivos ao longo das últimas décadas reflete a busca contínua por maior velocidade de resfriamento, menor volume de solução vitrificante e maior segurança sanitária (Vajta; Kuwayama, 2006; Marin *et al.*, 2020).

As palhetas convencionais de 0,25 mL (French straws) foram os primeiros dispositivos utilizados na vitrificação de embriões bovinos. Por possuírem paredes relativamente espessas e acomodarem maior volume de solução, as taxas de resfriamento atingidas são relativamente baixas (cerca de 2.500°C/min), o que exige concentrações mais elevadas de crioprotetores para

garantir a vitrificação. Sua vantagem é a compatibilidade com inovuladores de transferência convencionais, tornando o dispositivo compatível com a infraestrutura já disponível nos laboratórios de PIVE. As palhetas de 0,5 mL apresentam desempenho inferior às de 0,25 mL para vitrificação, sendo utilizadas principalmente em congelamento lento (Santin *et al.*, 2009).

A *Open Pulled Straw* (OPS) representa um avanço fundamental na vitrificação de embriões bovinos. Desenvolvida por Vajta *et al.* (1997, 1998), a OPS é obtida a partir de uma palheta convencional de 0,25 mL submetida a um processo de estiramento a quente, que reduz seu diâmetro interno de aproximadamente 1,0 mm para 0,8 mm e sua espessura de parede de 0,15 mm para cerca de 0,07 mm. Com esse tratamento, o volume de solução carregado é inferior a 1 μ L e as taxas de resfriamento em contato direto com o nitrogênio líquido superam 20.000°C/min. A OPS proporcionou melhora expressiva nas taxas de sobrevivência e prenhez com embriões PIVE vitrificados, tornando-se o dispositivo mais amplamente utilizado em protocolos de pesquisa e em programas comerciais de PIVE bovina no Brasil (Vajta *et al.*, 1998; Ramos, 2025).

O Cryotop, descrito por Kuwayama *et al.* (2005), consiste em uma folha plástica ultrafina (espessura de 0,4 mm) fixada a um cabo, na qual o embrião é carregado em volume mínimo de solução vitrificante, inferior a 0,1 μ L. O dispositivo é coberto por uma manga protetora e imerso no nitrogênio líquido, atingindo taxas de resfriamento superiores a 23.000°C/min. Estudos com embriões e oócitos bovinos demonstraram que o Cryotop proporciona taxas de reexpansão e de maturidade nuclear superiores às obtidas com OPS e palhetas convencionais, posicionando-o como um dos dispositivos de maior desempenho para vitrificação de oócitos imaturos (SciELO, Cryotop, 2024; Kuwayama *et al.*, 2005). Entretanto, por ser um dispositivo aberto, o Cryotop expõe o material biológico diretamente ao nitrogênio líquido, suscitando preocupações regulatórias quanto ao risco de contaminação cruzada entre amostras (Marin *et al.*, 2020).

Os sistemas fechados de vitrificação, como o High Security Vitrification (HSV), o Rapid-I e o Cryopette, foram desenvolvidos para eliminar o contato direto do embrião com o nitrogênio líquido, reduzindo o risco de contaminação biológica. Nesses sistemas, o embrião é envasado em câmara selada antes da imersão. A desvantagem é a redução das taxas de resfriamento em comparação aos dispositivos abertos, o que pode exigir ajustes nos protocolos de crioprotetores. Para uso em bancos de germoplasma de acesso regulado, em importação e exportação de material genético, e em contextos onde biossegurança é requisito prioritário, os

sistemas fechados são a escolha recomendada pelas diretrizes internacionais (Marin *et al.*, 2020; Kuwayama *et al.*, 2005).

3.3.4 Desvitrificação e reidratação embrionária

A desvitrificação, ou processo de aquecimento e reidratação, é a etapa que sucede o armazenamento criogênico e precede a avaliação e transferência dos embriões vitrificados. Assim como o resfriamento, o aquecimento deve ser realizado com extremo cuidado para evitar a recristalização, fenômeno em que pequenos núcleos de gelo, que podem ter se formado durante a vitrificação, crescem ao atingir determinada faixa de temperatura, causando danos mecânicos às estruturas celulares (Dalcin; Lucci, 2010).

Para evitar a recristalização, o aquecimento deve ser realizado de forma ultrarrápida, especialmente na faixa crítica de -130°C a -60°C . Diferentes protocolos de aquecimento são utilizados dependendo do dispositivo de vitrificação empregado. Para OPS, o procedimento mais comum consiste na imersão direta do dispositivo carregado com o embrião em solução de reidratação (sacarose 0,5 M ou 0,25 M) pré-aquecida a 37°C – 39°C , com o embrião liberado imediatamente na solução. O contato com a solução aquecida promove aquecimento ultrarrápido, interrompendo qualquer possível processo de recristalização antes que os cristais atinjam dimensões danosas (Pyles, 2006; Ramos, 2025).

Para palhetas convencionais utilizadas no *Direct Transfer*, o aquecimento pode ser feito ao ar por 10 segundos, seguido de imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Em ambos os casos, a velocidade de aquecimento deve ser estritamente controlada para garantir que a transição da temperatura criogênica para a fisiológica ocorra de forma suficientemente rápida para evitar a recristalização e suficientemente gradual para não provocar choque osmótico ao embrião (Pyles, 2006; Jove, 2011).

Após o aquecimento, o embrião é submetido à reidratação gradual, que consiste na diluição progressiva dos crioprotetores intracelulares e na reentrada controlada de água na célula. Esse processo é realizado pela passagem sequencial do embrião por soluções com concentrações decrescentes de sacarose, tipicamente 0,5 M por 3 minutos, 0,25 M por 3 a 5 minutos, e 0,00 M (apenas meio de base) por 5 minutos, a 38°C – 39°C . A reidratação excessivamente rápida pode provocar choque osmótico reverso, causando inchaço celular e lise. A excessivamente lenta pode permitir a persistência de crioprotetores intracelulares em concentrações tóxicas por tempo prolongado (Pyles, 2006; Dalcin; Lucci, 2010).

Após a reidratação, os embriões são avaliados morfológicamente sob estereomicroscópio e colocados em cultivo *in vitro* por 1 a 2 horas, período durante o qual se observa a reexpansão da blastocle como indicativo de viabilidade. De acordo com os dados da Embrapa (2023) com o protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD), 95,6% dos embriões PIVE submetidos à vitrificação e ao protocolo de aquecimento padronizado apresentaram reexpansão da blastocle já nas primeiras 2 horas de cultivo pós-aquecimento, demonstrando a eficácia do protocolo de desvitrificação e reidratação desenvolvido. Outros estudos com embriões PIVE vitrificados em OPS e reaquecidos pelo protocolo de sacarose decrescente reportam taxas de reexpansão que variam entre 60% e 95%, dependendo da qualidade do embrião, do protocolo crioprotetor e das condições de laboratório (Ramos, 2025; Reyes, 2021).

3.3.5 Taxas de sobrevivência e prenhez

As taxas de sobrevivência e prenhez obtidas com embriões bovinos vitrificados variam na literatura em função de múltiplos fatores: tipo de embrião (*in vivo* ou *in vitro*), estágio de desenvolvimento, grau de qualidade morfológica, dispositivo de vitrificação utilizado, protocolo crioprotetor adotado, condições do laboratório e características das receptoras. Em linhas gerais, embriões *in vivo* respondem melhor à vitrificação do que os embriões PIVE, em função de sua menor carga lipídica intracitoplasmática e maior resistência ao chilling injury (Santin *et al.*, 2009; Ramos, 2025).

Para embriões *in vivo* vitrificados em OPS, estudos relatam taxas de gestação entre 45% e 65%, comparáveis às obtidas com embriões a fresco de qualidade equivalente. (Lopatarova *et al.*; Santin *et al.*, 2009), comparando vitrificação em OPS com o congelamento DT para embriões *in vivo*, não encontraram diferença estatisticamente significativa entre as taxas de gestação: 55,1% versus 54,1% para embriões Grau I, e 36,4% versus 32,9% para embriões Grau II, respectivamente. Esses resultados evidenciam que, para embriões *in vivo* de alta qualidade, ambas as técnicas de criopreservação são equivalentes em eficácia reprodutiva (Lopatarova *et al.*; Santin *et al.*, 2009).

Para embriões PIVE, as taxas de gestação após vitrificação situam-se tipicamente entre 25% e 50%, inferiores às taxas obtidas com embriões a fresco (40%–65%), mas com tendência de melhora progressiva conforme os protocolos são aperfeiçoados. (Martínez *et al.*, 2002; Ramos, 2025) afirmaram que a vitrificação pode ser utilizada com sucesso na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* em programas comerciais. Estudos comparativos entre congelamento lento e vitrificação para embriões PIVE demonstraram superioridade consistente

da vitrificação: a taxa de expansão embrionária após 24 horas foi de 89,0% e 86,2% para dois protocolos de vitrificação avaliados por Cuervo-Arango *et al.* (Reyes, 2021), contra 73,6% para o congelamento lento.

Um marco recente nessa área foi o desenvolvimento do Protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD), que associa vitrificação com transferência direta (*Direct Transfer*) para embriões PIVE. Os resultados *in vitro* demonstraram que 95,6% dos embriões Embrapa Vitrificação Direta (VD) estavam reexpandidos após apenas 2 horas de cultivo. In vivo, as taxas de prenhez foram de 33% para embriões Embrapa Vitrificação Direta (VD) versus 44% para embriões a fresco, sem diferença estatisticamente significativa. As taxas de perda gestacional também foram similares (22% vs 20%), indicando que o protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD) oferece resultados gestacionais comparáveis aos de embriões a fresco, representando um avanço expressivo para a aplicação comercial da vitrificação em programas de campo (Oliveira *et al.*, 2024).

Estudos complementares realizados por pesquisadores da Universidade Autônoma de Barcelona (Martinez-Rodriguez *et al.*, 2021) demonstraram que um período de equilíbrio mais curto na SV1 melhora os desfechos pós-aquecimento de embriões bovinos PIVE vitrificados pelo método *in-straw* (com transferência direta), resultando em maior sobrevivência e menor índice de apoptose celular. Esses resultados corroboram a tendência de que a simplificação e otimização dos tempos de exposição aos crioprotetores representam um caminho promissor para o aprimoramento das técnicas de vitrificação com transferência direta (Martinez-Rodriguez *et al.*, 2021).

3.4 Técnica de *Direct Transfer*

3.4.1 Conceito e vantagens do *Direct Transfer*

O *Direct Transfer* (DT), também denominado transferência direta, congelamento One-Step ou método de inovulação direta, é uma técnica de criopreservação embrionária na qual o embrião, após o descongelamento da palheta, é imediatamente inoculado no útero da receptora, sem nenhuma etapa intermediária de remoção do crioprotetor em bancada laboratorial. Essa característica confere ao DT uma praticidade operacional inigualável entre os métodos de criopreservação embrionária, tornando-o especialmente indicado para uso em programas de transferência de embriões in vivo conduzidos em campo, onde infraestrutura laboratorial é limitada ou inexistente (Leibo, 1984, Santin *et al.*, 2009; Alta Genetics, 2024).

O fundamento do DT reside na propriedade do etilenoglicol (EG) de ser bem tolerado pelo trato reprodutivo das receptoras em concentrações da ordem de 1,4 a 1,8 M, ao contrário do glicerol, crioprotetor clássico dos primeiros protocolos, que exigia diluição obrigatória por ser citotóxico ao endométrio. O EG é absorvido rapidamente pelo útero e sua eliminação pelo trato reprodutivo não causa danos às células uterinas nem interfere com a implantação embrionária, desde que utilizado nas concentrações e volumes definidos para o protocolo DT (Jove, 2011; Leibo, 1984, Santin *et al.*, 2009).

As principais vantagens do *Direct Transfer* podem ser sistematizadas nos seguintes pontos: (1) eliminação das etapas de descongelamento em banho-maria, avaliação pós-descongelamento e remoção do crioprotetor, reduzindo o tempo de manipulação do embrião fora do nitrogênio líquido a segundos; (2) redução de riscos de contaminação, lesão mecânica e variações de temperatura durante o processamento pós-descongelamento; (3) possibilidade de execução em campo sem laboratório, bastando dispor de um canister de nitrogênio líquido, um inovulador de embrião padrão de 0,25 mL e o protocolo de suporte mínimo; (4) redução de custos operacionais, pela dispensabilidade de equipamentos de descongelamento, reagentes específicos para remoção do crioprotetor e estrutura laboratorial no local de transferência; (5) maior rastreabilidade logística, pois o embrião permanece na mesma palheta de congelamento desde o processamento em laboratório até a inovulação na receptora; e (6) menor variabilidade operacional entre técnicos de campo, pela simplificação do protocolo (Alta Genetics, 2024; Santin *et al.*, 2009; Rumpf, 2007).

3.4.2 Protocolos aplicados ao *Direct Transfer*

O protocolo clássico de *Direct Transfer*, consolidado a partir dos trabalhos de Leibo (1984) e Dochi *et al.* (1995), envolve as seguintes etapas sequenciais: (1) avaliação e seleção do embrião (Grau 1 ou 2, estágio de blastocisto ou blastocisto expandido); (2) equilíbrio do embrião em soluções com concentrações crescentes de EG, habitualmente 0,5 M por 5 minutos, seguido de 1,0 M por 5 minutos, para promover a permeação gradual do crioprotetor ao interior das células sem causar danos osmóticos bruscos; (3) transferência do embrião para a palheta de 0,25 mL contendo a solução de congelamento com 1,4 a 1,8 M de EG, com ou sem sacarose (0,1 a 0,25 M) como crioprotetor não permeante auxiliar; (4) congelamento em máquina de curva controlada, com velocidade de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -7°C ; (5) indução da nucleação do gelo (seeding) a -7°C por método manual ou automático; (6) continuação do

resfriamento a $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -35°C ; e (7) imersão final em nitrogênio líquido a -196°C (Dochi *et al.*, 1995; Santin *et al.*, 2009; Cenatte, 2015; Viana, 2009).

O arranjo interno da palheta para DT é padronizado e deve ser rigorosamente respeitado para garantir que o embrião esteja adequadamente posicionado para a inovulação: coluna de meio de manutenção (coluna 1) | bolha de ar | solução crioprotetora com o embrião (coluna central) | bolha de ar | coluna de meio de manutenção (coluna 2). As colunas de meio funcionam como amortecedores das extremidades, e as bolhas de ar delimitam e protegem a coluna central onde o embrião está contido. Esse arranjo é essencial para que o embrião não entre em contato com o êmbolo do inovulador e para que a inovulação seja feita com precisão (Stringfellow; Givens, 2007; Viana, 2009).



Figura 1 - 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

Fonte: Embrapa

Estudos realizados por Dochi *et al.* (1995), comparando soluções com 1,8 M de EG puro e 1,8 M de EG + 0,25 M de sacarose para congelamento DT de mórulas e blastocistos bovinos *in vivo*, obtiveram taxas de gestação de 69% e 52%, respectivamente, após inovulação direta nas receptoras. Esses resultados indicaram que, para embriões *in vivo* de alta qualidade, o DT com EG puro apresentou desempenho superior à combinação com sacarose naquele protocolo específico, possivelmente pela maior toxicidade osmótica da combinação. Contudo, pesquisas subsequentes com diferentes concentrações de sacarose obtiveram resultados distintos, demonstrando que o efeito da sacarose é dependente da concentração utilizada (Dochi *et al.*, 1995, Santin *et al.*, 2009).

Variações do protocolo de DT publicadas na literatura incluem modificações na concentração de EG (de 1,0 M a 2,0 M), adição de diferentes crioprotetores não permeantes (sacarose, trealose, rafinose), variações na temperatura de seeding, ajustes na velocidade de resfriamento e no uso de máquinas automáticas de congelamento versus curvas manuais. A Embrapa (2011) padronizou um protocolo de DT para embriões *in vivo* com 1,5 M de EG em PBS + 10% de SFB, com seeding manual a -7°C e mergulho em nitrogênio líquido a -35°C , que se tornou referência para os laboratórios brasileiros de TE.

O protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD) representa a evolução mais recente do conceito de *Direct Transfer*, aplicado agora à vitrificação de embriões PIVE. Nesse protocolo, o embrião PIVE vitrificado em OPS é diretamente inserido na palheta de inovulação e transferido para a receptora sem etapa de reidratação prévia em bancada, eliminando a necessidade de equipamento de aquecimento no campo. A reidratação ocorre in vivo, no trato reprodutivo da receptora. Os resultados publicados pela Embrapa (2023) demonstraram taxas de prenhez de 33% para embriões Embrapa Vitrificação Direta (VD) versus 44% para embriões a fresco, sem diferença estatisticamente significativa, um resultado expressivo considerando a simplicidade operacional do método (Oliveira *et al.*, 2024).

3.4.3 Compatibilidade com diferentes crioprotetores

A compatibilidade do *Direct Transfer* com diferentes agentes crioprotetores é um tema amplamente investigado na literatura, uma vez que a viabilidade do protocolo depende, em última instância, da tolerância uterina da receptora ao crioprotetor presente na palheta no momento da inovulação (Leibo, 1984; Dochi *et al.*, 1995; Stringfellow; Givens, 2007; Martinez-Rodriguez *et al.*, 2021).

O glicerol, utilizado nos primeiros protocolos de congelamento de embriões bovinos, é altamente eficaz como crioprotetor e foi durante décadas o padrão no método convencional (com remoção obrigatória). Em concentrações necessárias ao congelamento (1,4 a 1,5 M), o glicerol provoca irritação e toxicidade celular ao endométrio uterino quando inoculado diretamente sem diluição prévia. Por isso, o glicerol não é compatível com o protocolo de *Direct Transfer* e sua aplicação requer rigorosamente a remoção em bancada laboratorial (Jove, 2011; Leibo, 1984, Santin *et al.*, 2009).

O etilenoglicol é o crioprotetor compatível com o DT por excelência. Seu baixo peso molecular (62 g/mol), alta permeabilidade celular, alta solubilidade em água e menor toxicidade endometrial em concentrações de 1,4 a 1,8 M permitem a inovulação direta sem comprometimento da fertilidade da receptora. Estudos in vivo confirmaram que a presença de EG em concentrações de até 1,8 M na palheta não afeta significativamente as taxas de implantação embrionária em receptoras bovinas, desde que o volume total inovulado seja o padrão da palheta de 0,25 mL (Jove, 2011; Dochi *et al.*, 1995; Santin *et al.*, 2009).

O propilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO) têm sido avaliados como alternativas ou associações ao EG em protocolos de DT. O propilenoglicol apresenta menor eficiência crioprotetora que o EG para embriões bovinos e maior viscosidade, dificultando a manipulação.

O DMSO, embora eficaz como crioprotetor, apresenta toxicidade tecidual quando utilizado em altas concentrações e é metabolizado em produtos voláteis de odor característico que podem interferir com o microambiente uterino. Por essas razões, o EG permanece como a escolha preferencial para protocolos de DT em bovinos (Santin *et al.*, 2009; Dalcin; Lucci, 2010).

3.4.4 Resultados e eficiência reprodutiva

A eficiência reprodutiva do *Direct Transfer* para embriões bovinos produzidos in vivo é bem estabelecida na literatura, com taxas de gestação consistentemente boas e comparáveis às obtidas com embriões a fresco quando os protocolos são corretamente executados. Estudos conduzidos por Dochi *et al.* (1995) com embriões in vivo reportaram taxas de gestação de 69% com DT em EG puro, resultados que equiparam o DT ao congelamento convencional com remoção do crioprotetor e que fundamentaram a adoção do método em escala comercial (Dochi *et al.*, 1995; Santin *et al.*, 2009). Lopatarova *et al.* e Santin *et al.*, em estudo comparativo de maior escala com embriões in vivo, obtiveram taxas de prenhez de 54,1% para DT e 55,1% para vitrificação em OPS com embriões Grau I, e de 32,9% e 36,4%, respectivamente, para embriões Grau II. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos reforça a equivalência entre as duas técnicas para embriões de origem in vivo.

Para embriões PIVE, os resultados com DT convencional são historicamente inferiores aos obtidos com embriões in vivo, refletindo a maior sensibilidade dos embriões PIVE ao chilling injury durante o congelamento lento. Taxas de gestação de 20% a 35% são frequentemente relatadas para embriões PIVE congelados por DT em protocolos convencionais (Cenatte, 2015; Oliveira *et al.*, 2024). Esse desempenho inferior é atribuído principalmente à maior carga lipídica intracitoplasmática dos embriões PIVE, que favorece os danos por chilling injury durante a rampa de resfriamento lento do método convencional (Santin *et al.*, 2009).

O protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD) foi desenvolvido justamente para superar essa limitação, associando a proteção criobiológica superior da vitrificação à praticidade operacional do *Direct Transfer*. Com o protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD), embriões PIVE vitrificados são transferidos diretamente para as receptoras sem etapa de reidratação em laboratório, e os resultados publicados (33% de prenhez para Embrapa Vitrificação Direta (VD) vs 44% para embriões a fresco, sem diferença estatística) representam um avanço considerável em relação aos resultados com DT convencional para embriões PIVE (Oliveira *et al.*, 2024).

Na prática comercial brasileira, o *Direct Transfer* consolidou-se como a técnica padrão para criopreservação de embriões bovinos in vivo transferidos em campo. Empresas de biotecnologia reprodutiva como a Alta Genetics comercializam embriões bovinos PIVE congelados com tecnologia DT, destacando a facilidade operacional e a rastreabilidade como diferenciais competitivos. A crescente demanda do mercado por embriões com tecnologia DT, aliada ao desenvolvimento de protocolos como o Embrapa Vitrificação Direta (VD), posiciona o *Direct Transfer* como componente estratégico e dinâmico do setor de biotecnologia reprodutiva bovina brasileiro (Alta Genetics, 2024; Oliveira *et al*, 2024).

3.5 Comparativo entre Vitrificação e *Direct Transfer*

3.5.1 Vantagens e limitações de cada técnica

A análise comparativa entre a vitrificação e o *Direct Transfer* deve ser realizada com base em múltiplos critérios, que incluem eficiência biológica (taxas de sobrevivência e prenhez), complexidade técnica, requisitos de infraestrutura, biossegurança, custo-benefício e adequação ao tipo de embrião utilizado (Mapletoft, 2013; Phillips; Jahnke, 2016; Dalcin; Lucci, 2010; Stringfellow; Givens, 2007; Pugliesi *et al.*, 2024).

A vitrificação apresenta como principais vantagens: (a) ausência total de cristais de gelo, resultando em taxas de sobrevivência superiores, especialmente para embriões PIVE; (b) taxas de reexpansão próximas a 100% com embriões de alta qualidade em protocolos bem estabelecidos; (c) menor tempo total de processamento por embrião no momento do congelamento; (d) flexibilidade para uso com diferentes dispositivos e volumes; e (e) eliminação do risco de chilling injury durante a rampa de congelamento, que é inexistente no processo de vitrificação. Como limitações, a vitrificação exige: treinamento técnico específico para o manuseio dos dispositivos, especialmente OPS e Cryotop; infraestrutura laboratorial para realização do reaquecimento e da reidratação gradual; atenção rigorosa ao controle dos tempos de exposição às soluções; e, para protocolos com dispositivos abertos, medidas adicionais de biossegurança para evitar contaminação cruzada (Vajta; Kuwayama, 2006; Marin *et al.*, 2020).

O *Direct Transfer* destaca-se pela simplicidade operacional: o técnico de campo pode descongelar e inovular o embrião sem infraestrutura laboratorial, utilizando apenas o canister de nitrogênio e o inovulador de transferência padrão juntamente com a bainha. Isso reduz significativamente o número de etapas e a probabilidade de erros humanos durante o processamento pós-descongelamento. Adicionalmente, o DT elimina os riscos de danos

decorrentes do manuseio laboratorial pós-descongelamento, aquecimento por contato manual, choque osmótico durante a remoção do crioprotetor, contaminação durante a remoção. As principais limitações são: (a) menor eficiência para embriões PIVE, que são mais sensíveis ao chilling injury durante o congelamento lento; (b) necessidade de equipamento de congelamento lento com curva controlada (máquina programável) no momento do processamento dos embriões em laboratório; (c) maior variabilidade de resultados quando o protocolo de congelamento não é executado com rigor técnico (Cenatte, 2015; Alta Genetics, 2024).

Em síntese, para embriões bovinos produzidos *in vivo* de alta qualidade morfológica, ambas as técnicas apresentam resultados reprodutivos equivalentes. A escolha entre elas deve ser guiada principalmente pelas condições de campo, pela disponibilidade de infraestrutura e pela experiência técnica da equipe. Para embriões PIVE, a vitrificação é tecnicamente superior em termos de sobrevivência pós-criopreservação, embora o protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD) ofereça uma alternativa prática que busca combinar a eficiência biológica da vitrificação com a simplicidade logística do DT (Oliveira *et al.*, 2024; Lopatarova *et al.*, Santin *et al.*, 2009).

3.5.2 Indicações práticas de uso

Com base na revisão da literatura científica e nos dados técnicos disponíveis, é possível estabelecer diretrizes práticas para a seleção entre vitrificação e *Direct Transfer* nas diferentes situações encontradas na rotina da reprodução bovina (Mapletoft, 2013; Phillips; Jahnke, 2016; Stringfellow; Givens, 2007; Pugliesi *et al.*, 2024).

A vitrificação é indicada preferencialmente nas seguintes situações: (a) embriões produzidos *in vitro* (PIVE), pela proteção superior contra o chilling injury; (b) programas de exportação ou transporte internacional de material genético, especialmente com dispositivos fechados para cumprimento das exigências sanitárias internacionais; (c) bancos de germoplasma com exigências regulatórias específicas quanto à biossegurança e à rastreabilidade dos lotes; (d) laboratórios equipados com infraestrutura completa para reaquecimento, reidratação e avaliação pós-aquecimento; e (e) programas em que a maximização das taxas de prenhez é o objetivo principal, independentemente do custo ou da complexidade técnica (Marin *et al.*, 2020; Vajta; Kuwayama, 2006; Oliveira *et al.*, 2024).

O *Direct Transfer* é indicado preferencialmente nas seguintes situações: (a) embriões produzidos *in vivo* (por superovulação e lavagem uterina), que apresentam composição lipídica mais favorável ao congelamento lento; (b) programas de TE conduzidos em campo, sem acesso

a laboratório equipado para reaquecimento e reidratação; (c) logística de distribuição de embriões para múltiplas propriedades e técnicos, em que a simplicidade do protocolo de campo é um diferencial decisivo; e (d) cenários em que o custo operacional por embrião transferido é um fator limitante, pois o DT dispensa reagentes e equipamentos específicos para o processamento pós-descongelamento (Alta Genetics, 2024; Santin *et al.*, 2009; Cenatte, 2015).

Uma tendência emergente é a utilização do protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD), que associa vitrificação com transferência direta para embriões PIVE, em programas comerciais de campo, ampliando gradualmente as fronteiras entre as duas técnicas. À medida que kits comerciais de vitrificação com suporte para DT tornam-se mais acessíveis, espera-se que essa abordagem híbrida ganhe espaço crescente no mercado brasileiro de biotecnologia reprodutiva bovina (Oliveira *et al.*, 2024; Rumpf, 2007).

3.5.3 Custo-benefício e aplicabilidade no campo

A análise de custo-benefício entre vitrificação e *Direct Transfer* é complexa e dependente do contexto operacional específico de cada programa de reprodução bovina. Diferentes variáveis compõem o custo por embrião transferido: equipamentos de laboratório, reagentes, dispositivos, tempo de técnico, custo de transporte dos embriões, taxa de prenhez e valor genético do embrião produzido (Phillips; Jahnke, 2016; Dalcin; Lucci, 2010; Mapletoft, 2013; Pugliesi *et al.*, 2024).

Para laboratórios de PIVE com alto volume de produção, os custos marginais dos dispositivos de vitrificação e das soluções específicas são diluídos pela escala, tornando a vitrificação economicamente competitiva em relação ao congelamento lento. O custo de um dispositivo OPS, por exemplo, é mínimo em relação ao valor de um embrião PIVE de alto valor genético. Por outro lado, em programas de TE in vivo de menor escala realizados em campo, o DT elimina a necessidade de equipamentos de reaquecimento e reagentes de remoção do crioprotetor no local de transferência, traduzindo-se em redução significativa dos custos operacionais por embrião transferido (Ramos, 2025; Cenatte, 2015).

A relação custo-benefício deve também considerar as taxas de prenhez como variável central. Para embriões PIVE, mesmo que o custo de processamento pela vitrificação seja marginalmente superior ao do DT convencional, a obtenção de taxas de prenhez 10 a 15 pontos percentuais superiores pode justificar amplamente esse diferencial de custo, especialmente quando os embriões vitrificados são de genótipos de alto valor zootécnico (Reyes, 2021; Oliveira *et al.*, 2024).

3.6 Bases legais e normativas para a criopreservação e transferência de embriões bovinos no Brasil

A realização de procedimentos de criopreservação e transferência de embriões bovinos no Brasil está inserida em um conjunto de marcos regulatórios que visam garantir a rastreabilidade, a sanidade animal e a padronização das práticas executadas pelos estabelecimentos envolvidos. O conhecimento dessas bases legais é indispensável para o profissional da área de reprodução animal, uma vez que orienta tanto a atuação técnica quanto a adequação dos laboratórios e equipes às exigências do poder público (Brasil, 2018; MAPA, 2023; Brasil, 2024a; Brasil, 2024b).

3.6.1 Marco regulatório federal: Lei nº 15.021/2024

A Lei nº 15.021, de 12 de novembro de 2024, constitui o principal marco regulatório do material genético animal no Brasil. Referida lei dispõe sobre o controle e a fiscalização da produção, da manipulação, da importação, da exportação e da comercialização de material genético animal, abrangendo expressamente embriões, oócitos e demais materiais de multiplicação de animais domésticos de interesse zootécnico (Brasil, 2024a). A norma revogou a Lei nº 6.446/1977, que até então regulamentava a matéria, e representa uma atualização legislativa significativa para o setor de reprodução animal, estabelecendo ainda as diretrizes para o registro dos fornecedores junto ao órgão federal competente como condição para o exercício das atividades de produção e comercialização de material genético (Brasil, 2024a).

3.6.2 Registro e fiscalização dos estabelecimentos: Portaria SDA/MAPA nº 1.204/2024

No plano infralegal, a Portaria SDA/MAPA nº 1.204, de 28 de novembro de 2024, regulamenta os procedimentos para registro, controle e fiscalização dos estabelecimentos de coleta e processamento de embriões de animais domésticos (Brasil, 2024b). Referida portaria classifica esses estabelecimentos em três categorias: o Centro de Coleta e Processamento de Embriões (CCPE), onde os animais são reunidos para a realização da coleta e do processamento; o Estabelecimento Prestador de Serviço em Coleta e Processamento de Embriões (EPSE), que executa tais atividades em propriedades de terceiros para uso exclusivo nessas propriedades; e o Centro de Produção *In vitro* de Embriões (CPIVE), destinado à maturação e fecundação de oócitos e ao cultivo de embriões (Brasil, 2024b). A norma também exige a elaboração e cumprimento de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs),

instrumentos que visam assegurar a qualidade, a identidade e a rastreabilidade do material produzido em cada estabelecimento.

3.6.3 Rastreabilidade e identificação dos embriões

A rastreabilidade é um dos pilares centrais da regulamentação vigente. A Portaria SDA/MAPA nº 1.204/2024 determina que os embriões obtidos de produção *in vivo* sejam envasados em embalagens com identificação mínima obrigatória, incluindo o código DT para embriões destinados à transferência direta, o número da palheta, o registro genealógico da doadora e a identificação do doador do sêmen, todos precedidos dos respectivos códigos de raça padronizados internacionalmente (Brasil, 2024b). Essas exigências garantem a identificação inequívoca do material genético ao longo de toda a cadeia produtiva, sendo essenciais tanto para fins comerciais quanto para o controle sanitário e genealógico dos rebanhos bovinos.

3.6.4 Requisitos zoossanitários para importação de embriões bovinos: Instrução Normativa nº 38/2018

No que diz respeito ao trânsito internacional de material embrionário, a Instrução Normativa nº 38, de 25 de julho de 2018, incorpora ao ordenamento jurídico brasileiro os requisitos zoossanitários do MERCOSUL para a importação de embriões de bovinos e bubalinos coletados *in vivo* e produzidos *in vitro* (Brasil, 2018). A norma determina que os embriões devem ser coletados, processados e armazenados em conformidade com as recomendações do Código Sanitário para os Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e do Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), sendo obrigatória a utilização do protocolo de lavagens suplementares com tripsina (Brasil, 2018). Adicionalmente, após as lavagens, a zona pelúcida de cada embrião deve ser inspecionada com microscópio de aumento mínimo de 50 vezes, verificando-se sua integridade e a ausência de material aderente em sua superfície (Brasil, 2018). Tais exigências evidenciam a harmonização da legislação nacional com os padrões internacionais de biossegurança aplicáveis à transferência embrionária.

3.6.5 Fiscalização permanente e responsabilidade técnica

O Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), por meio da estrutura de defesa agropecuária, é responsável pelo controle dos estabelecimentos de coleta e processamento de embriões, bem como pelo monitoramento dos exames sanitários dos animais doadores (Brasil,

2024b). Os estabelecimentos registrados são obrigados ao envio periódico de relatórios de produção e comercialização, e estão sujeitos a auditorias regulares conduzidas por Fiscais Federais Agropecuários (Brasil, 2024). Nesse contexto, o médico veterinário responsável técnico ocupa posição central, respondendo pela conformidade de todas as etapas do processo, desde a seleção dos animais doadoras até o acondicionamento e expedição dos embriões criopreservados, em observância às disposições da Lei nº 15.021/2024 e da Portaria SDA/MAPA nº 1.204/2024.

3.7 Boas práticas na criopreservação de embriões bovinos

A criopreservação de embriões bovinos, para que produza resultados reprodutivos consistentes e sanitariamente seguros, depende não apenas da escolha adequada do protocolo técnico, mas também da adoção rigorosa de boas práticas em todas as etapas do processo. Essas práticas abrangem desde a estrutura física e o controle ambiental do laboratório até o manuseio e armazenamento do material biológico em nitrogênio líquido, passando pelo controle de qualidade dos insumos e pela rastreabilidade individual de cada embrião processado (Stringfellow; Givens, 2007). A IETS estabelece, em seu Manual de Procedimentos, os padrões mínimos internacionais que orientam a organização dos laboratórios de transferência de embriões e a conduta dos profissionais envolvidos, reconhecendo que a padronização das rotinas é condição indispensável para a obtenção de taxas de sobrevivência e prenhez reprodutíveis entre laboratórios e ao longo do tempo (Stringfellow; Givens, 2007). No contexto brasileiro, as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e as diretrizes da FAO para a gestão de bancos de germoplasma reforçam essa perspectiva, ao atribuir ao laboratório responsabilidade técnica, sanitária e documental sobre o material genético processado (FAO, 2021; MAPA, 2023). Os tópicos a seguir detalham as principais dimensões das boas práticas aplicadas à criopreservação embrionária bovina.

3.7.1 Condições de laboratório e biossegurança

As boas práticas de laboratório aplicadas à criopreservação de embriões bovinos têm como objetivo garantir a viabilidade dos embriões processados, a segurança sanitária do material biológico, a proteção dos operadores e a reprodutibilidade dos resultados ao longo do tempo. A padronização rigorosa das condições laboratoriais é condição indispensável para a

obtenção de resultados reprodutivos consistentes, rastreáveis e auditáveis (Stringfellow; Givens, 2007; FAO, 2021).

O laboratório destinado à criopreservação de embriões deve atender a requisitos mínimos de infraestrutura: temperatura ambiente controlada entre 20°C e 25°C, ausência de correntes de ar e variações bruscas de temperatura durante a manipulação dos embriões, iluminação adequada para avaliação microscópica sem aquecimento excessivo das superfícies de trabalho, bancadas planas, antivibratórias e de fácil higienização. O acesso deve ser restrito ao pessoal autorizado e treinado, e a limpeza e desinfecção das superfícies deve ser realizada com periodicidade definida, utilizando soluções virucidas e bactericidas compatíveis com os materiais presentes (Stringfellow; Givens, 2007; Marin *et al.*, 2020).

Os equipamentos essenciais para a criopreservação embrionária bovina incluem: estereomicroscópio com objetivas de 10 a 40 vezes com placa aquecedora integrada (38°C–39°C), placa aquecida autônoma para manutenção dos embriões durante a manipulação, pipetas de transferência calibradas (volumes de 1 a 5 µL), dispositivos de vitrificação (OPS, Cryotop, palhetas), tanques de nitrogênio líquido para armazenamento e transporte, máquina automática de congelamento com curva programável (para protocolos DT), e incubadora de CO₂ para cultivo de avaliação pós-aquecimento. Todos os equipamentos devem ser calibrados periodicamente, com registros de calibração disponíveis para auditoria (Stringfellow; Givens, 2007; Dalcin; Lucci, 2010).

A biossegurança é aspecto fundamental na rotina da criopreservação embrionária, especialmente considerando os riscos de transmissão de patógenos através do material biológico e do nitrogênio líquido. O nitrogênio líquido, embora seja um meio criogênico estéril no momento da produção industrial, pode ser contaminado por patógenos presentes em dispositivos de vitrificação abertos que entram em contato com o líquido do tanque. Estudos publicados por Marin *et al.* (2020) demonstraram experimentalmente, em modelo de coelho, que tanto a contaminação cruzada (de embriões para o nitrogênio) quanto a infecção cruzada (do nitrogênio para os embriões) são possíveis quando dispositivos abertos são utilizados sem medidas de segregação adequadas. Por esse motivo, o uso de dispositivos fechados é recomendado para armazenamento em bancos de germoplasma e para transporte internacional, onde a segregação sanitária é requisito regulatório (Marin *et al.*, 2020; Joaquim, 2017).

No tocante à saúde dos operadores, o manuseio de nitrogênio líquido exige uso obrigatório de luvas criogênicas de isolamento térmico, óculos de proteção e avental de proteção. Exposição da pele ao nitrogênio líquido ou aos seus vapores pode causar queimaduras

criogênicas graves em frações de segundo. Ambientes fechados com grande volume de nitrogênio líquido exigem ventilação adequada para prevenir o deslocamento do oxigênio atmosférico, fenômeno que pode levar à hipóxia dos operadores sem sinais de alerta prévio. Detectores de oxigênio com alarme sonoro são recomendados em salas de armazenamento de nitrogênio (Joaquim, 2017; , 2025).

3.7.2 Manuseio e armazenamento em nitrogênio líquido

O nitrogênio líquido (NL₂) é o meio criogênico universalmente utilizado para armazenamento de embriões bovinos e demais materiais biológicos criopreservados, por manter temperatura constante de -196°C e apresentar disponibilidade industrial ampla e custo acessível. A manutenção correta do nitrogênio e dos tanques criogênicos é condição indispensável para a preservação da integridade do material armazenado a longo prazo (, 2025; Joaquim, 2017).

Os tanques de nitrogênio líquido utilizados para armazenamento de embriões devem ser submetidos à inspeção regular quanto ao nível de nitrogênio, que deve ser mantido acima do mínimo recomendado pelo fabricante, geralmente suficiente para manter todos os canisters e as palhetas completamente submersos ou na fase de vapor de temperatura inferior a -150°C . A perda de nitrogênio por evaporação é inevitável e varia conforme o modelo do tanque, a frequência de abertura, as condições ambientais e o estado de vedação do isolamento a vácuo. Tanques modernos de alta performance apresentam taxas de evaporação inferiores a 0,1 L/dia, mas tanques mais antigos ou danificados, especialmente aqueles com comprometimento do isolamento a vácuo, podem perder volumes significativamente maiores (, 2025).

O monitoramento do nível de nitrogênio deve ser realizado com sensores automáticos de nível, associados a alarmes de baixo nível com disparo em tempo real. Em laboratórios e centrais de genética de grande porte, recomenda-se a utilização de sistemas de monitoramento redundantes com leituras de temperatura e nível a cada 15 a 30 minutos, registros automatizados e alerta remoto por SMS ou aplicativo dedicado. Essa estrutura garante a cadeia de custódia ininterrupta do material biológico e permite a intervenção imediata em caso de falha do tanque ou queda do nível de nitrogênio (, 2025; Joaquim, 2017).

O sistema de organização interna dos tanques é fundamental para a rastreabilidade e o acesso eficiente ao material armazenado. Os canisters (gaiolas cilíndricas de alumínio) devem ser numerados e associados a registros detalhados de seu conteúdo. Cada gobelet (copo plástico dentro do canister) deve corresponder a um lote específico de palhetas, com identificação clara

por cor, número ou código alfanumérico. A organização hierárquica tanque → canister → gobelet → palheta, com registro fiel em planilha eletrônica ou software de gestão de germoplasma, é a estrutura recomendada para garantir rastreabilidade completa de cada embrião armazenado (Stringfellow; Givens, 2007; , 2025).

Durante as operações de busca e transferência de palhetas no tanque, é imprescindível que todas as manipulações sejam realizadas de forma rápida, mantendo as palhetas permanentemente abaixo do nível do nitrogênio líquido ou, no mínimo, na fase de vapor à temperatura abaixo de -150°C . A exposição acidental de palhetas vitrificadas ao ar ambiente, mesmo por poucos segundos acima de -130°C , pode desencadear a recristalização do material criopreservado, comprometendo irreversivelmente a viabilidade dos embriões sem que qualquer alteração morfológica seja visível durante a avaliação pós-aquecimento. Para evitar esse risco, o uso de pinças criogênicas pré-resfriadas e a execução das buscas em tanque com nível de nitrogênio adequado são medidas obrigatórias (Stringfellow; Givens, 2007; Dalcin; Lucci, 2010).

3.7.3 Controle de qualidade e rastreabilidade

O controle de qualidade em programas de criopreservação embrionária bovina envolve a implementação de procedimentos sistemáticos que garantam a consistência dos resultados reprodutivos, a integridade do material genético armazenado e o cumprimento dos padrões técnicos e sanitários estabelecidos pela IETS e pelos órgãos regulatórios nacionais e internacionais (Stringfellow; Givens, 2007; FAO, 2021).

Um componente essencial do controle de qualidade é a avaliação morfológica sistemática de todos os embriões antes e após a criopreservação. A avaliação pré-criopreservação documenta, para cada embrião, o estágio de desenvolvimento, o grau morfológico (1 a 4 segundo a IETS), a integridade da zona pelúcida e quaisquer particularidades morfológicas observadas. A avaliação pós-aquecimento, realizada após 1 a 2 horas de cultivo em incubadora, documenta a taxa de reexpansão da blastocle e a integridade morfológica do embrião. O registro sistemático dessas informações compõe o histórico de qualidade de cada lote e permite identificar tendências e padrões de desempenho ao longo do tempo, orientando ajustes nos protocolos (Stringfellow; Givens, 2007; Oliveira *et al*, 2024).

A rastreabilidade do material genético bovino criopreservado é exigência regulatória em vários países e requisito indispensável para a comercialização internacional de embriões. No Brasil, a comercialização de embriões bovinos é regulada pelo Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece exigências de identificação das doadoras, dos reprodutores utilizados, dos embriões produzidos, das técnicas empregadas e das receptoras. Esses registros devem ser mantidos pelo laboratório responsável pelo programa de TE por período mínimo definido em regulamentação específica e devem estar disponíveis para inspeção pelos órgãos fiscalizadores competentes (Stringfellow; Givens, 2007; MAPA, 2023).

A rastreabilidade individual de cada palheta exige, no mínimo, as seguintes informações impressas ou gravadas na própria palheta: nome ou código da doadora, identificação do reprodutor, data de processamento, estágio de desenvolvimento do embrião, grau morfológico, técnica de criopreservação utilizada e número do lote ou da coleta. Sistemas de codificação por cores de palheta, por gravação a laser e por etiquetas adesivas criogeicamente resistentes são recursos amplamente utilizados para garantir a legibilidade das informações mesmo após longos períodos de armazenamento em nitrogênio líquido (, 2025; Stringfellow; Givens, 2007).

A validação periódica dos protocolos de criopreservação utilizados é outro componente crítico do controle de qualidade. Cada laboratório deve manter registros históricos das taxas de sobrevivência e prenhez obtidas por protocolo, por tipo de embrião e por técnica, com análise estatística regular para identificação de desvios e implementação de ações corretivas. A participação em programas de controle de qualidade interlaboratorial, com intercâmbio de amostras e comparação de resultados entre laboratórios, é recomendada pela IETS como ferramenta de validação externa dos protocolos em uso (Dalcin; Lucci, 2010; , 2025).

3.7.4 Erros comuns e como evitá-los

A prática da criopreservação embrionária, tanto por vitrificação quanto por *Direct Transfer*, está sujeita a erros técnicos cujas consequências se manifestam como redução das taxas de sobrevivência e prenhez. A identificação sistemática desses erros e o desenvolvimento de estratégias preventivas são partes essenciais do treinamento técnico e da padronização dos procedimentos operacionais (Stringfellow; Givens, 2007; Dalcin; Lucci, 2010).

Na técnica de vitrificação, os erros mais frequentes e de maior impacto incluem: (1) Tempo excessivo de exposição à SV2, mesmo segundos a mais além do protocolo podem causar toxicidade crioprotetora irreversível ao embrião; a solução é o uso de cronômetro preciso e disciplina rigorosa no controle do tempo. (2) Temperatura inadequada das soluções, soluções frias aumentam a viscosidade e reduzem a velocidade de permeação dos crioprotetores, comprometendo o equilíbrio osmótico; soluções excessivamente quentes aumentam a toxicidade. (3) Demora na transferência do dispositivo para o nitrogênio após o contato com

SV2, cada segundo de demora entre a última exposição ao crioprotetor e a imersão no nitrogênio aumenta exponencialmente os danos tóxicos e osmóticos ao embrião. (4) Exposição acidental das palhetas vitrificadas ao ar durante o manuseio no canister, causa recristalização silenciosa irreversível. (5) Reaquecimento lento durante a desvitrificação, a passagem lenta pela faixa de -130°C a -60°C favorece a recristalização (Santin *et al.*, 2009; Dalcin; Lucci, 2010).

No *Direct Transfer*, os erros mais comuns envolvem: (1) Velocidade de resfriamento inadequada durante o congelamento lento, decorre de máquinas descalibradas, interrupções de energia ou início do congelamento com temperatura de pré-resfriamento incorreta; a solução é a calibração periódica da máquina e o monitoramento com termômetro externo. (2) Falha na indução da nucleação do gelo (seeding), a ausência de seeding ou sua realização em temperatura incorreta resulta em superesfriamento seguido de cristalização desordenada; em máquinas automáticas, esse passo deve ser programado corretamente; em curvas manuais, o seeding é realizado com pinça de metal pré-resfriada aplicada sobre a palheta a -7°C . (3) Concentração incorreta de EG na solução, erros de pesagem, uso de reagentes fora do prazo de validade ou de pureza inadequada; a solução é a validação analítica dos reagentes e o preparo da solução sempre no dia do uso. (4) Volume incorreto na palheta, volumes excessivos ou insuficientes alteram a relação embrião/crioprotetor; o carregamento deve ser monitorado sob estereomicroscópio. (5) Descongelamento acidental, exposição à temperatura ambiente durante transporte ou movimentação dos tanques; tanques de transporte com isolamento adequado e monitoramento da temperatura são medidas preventivas essenciais (Cenatte, 2015; Santin *et al.*, 2009).

Erros comuns a ambas as técnicas incluem: (1) Avaliação morfológica imprecisa dos embriões, resultando na criopreservação de estruturas Grau 3 ou 4 sem potencial de desenvolvimento pós-aquecimento. (2) Identificação incorreta das palhetas, erro humano de anotação que compromete a rastreabilidade e pode levar a transferências incorretas. (3) Contaminação bacteriana ou fúngica do material biológico por higienização deficiente do laboratório, equipamentos ou reagentes. (4) Qualidade do nitrogênio líquido inadequada, nitrogênio contaminado, com presença de umidade, óleo ou impurezas industriais; o nitrogênio deve ser adquirido de fornecedores certificados e armazenado em tanques exclusivos para uso biológico. (5) Temperatura inadequada da placa aquecida durante a manipulação, variações de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ já podem comprometer a permeação dos crioprotetores e a vitalidade embrionária (Marin *et al.*, 2020; Stringfellow; Givens, 2007).

Para a prevenção sistemática desses erros, a elaboração e implementação de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) detalhados para cada etapa do processo de criopreservação é medida indispensável. Os POPs devem incluir: descrição passo a passo de cada procedimento, especificação de materiais e reagentes com fornecedores e números de lote, critérios de aceitação e rejeição de lotes de reagentes, fluxogramas de decisão para situações de não conformidade e checklists de verificação a serem preenchidos pelo operador em cada sessão. O treinamento regular dos técnicos, com avaliações práticas periódicas e supervisão por profissional habilitado, complementa a estrutura de prevenção de erros e garante a manutenção dos resultados reprodutivos nos programas de criopreservação embrionária bovina (Stringfellow; Givens, 2007; FAO, 2021; , 2025).

4. MANUAL TÉCNICO

Manual técnico sobre Criopreservação de Embriões Bovinos



SUMÁRIO

01 Contexto e justificativa

02 Fundamentos criobiológicos

03 Produção in vitro de embriões (PIVE)

04 Crioprotetores

05 Vitrificação

06 Direct Transfer

07 Como escolher?

08 Boas práticas e erros comuns

09 Procedimento operacional padrão (POP)

10 Considerações finais

Lista de siglas e abreviaturas

Sigla / Abreviatura	Significado / Definição
AIE	Aspiração Intrafolicular Ecoguiada (sinônimo de OPU)
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BSA	Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina (Bovine Spongiform Encephalopathy)
Bx	Blastocisto expandido
CCO	Complexo Cumulus-Oócito
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CIDR	Dispositivo Intravaginal de Liberação Controlada de Progesterona (Controlled Internal Drug Release)
CIV	Cultivo In Vitro
CPA	Agente Crioprotetor (Cryoprotective Agent)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT	Direct Transfer (Transferência Direta)
EG	Etilenoglicol (Ethylene Glycol)
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico (Epidermal Growth Factor)

EPI	Equipamento de Proteção Individual
ES	Solução de Equilíbrio (Equilibration Solution)
FIV	Fertilização In Vitro
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante (Follicle-Stimulating Hormone)
HM	Holding Medium — PBS + 5% SFB; meio de manutenção a 38 °C
HSV	High Security Vitrification (vitrificação de alta segurança em sistema fechado)
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
ID	Identificação
IETS	Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (International Embryo Technology Society)
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (Insulin-like Growth Factor 1)
IN	Instrução Normativa
LH	Hormônio Luteinizante (Luteinizing Hormone)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCI	Massa Celular Interna
MI	Metáfase I (estágio da meiose)

MII	Metáfase II (oócito maduro)
MIV	Maturação In Vitro
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
MV	Médico Veterinário
NC	Não Conformidade
NL / NL₂	Nitrogênio Líquido (-196 °C)
NR-9	Norma Regulamentadora nº 9 — Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (MTE)
NR-32	Norma Regulamentadora nº 32 — Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde (MTE)
OIE / WOAH	Organização Mundial de Saúde Animal (World Organisation for Animal Health)
OPS	Open Pulled Straw — palheta estirada artesanalmente para vitrificação (~100–150 µm de Ø interno)
OPU	Ovum Pick-Up — aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PHE	Mistura de Penicilamina + Hipotaurina + Epinefrina (capacitação espermática)
PIVE	Produção In Vitro de Embriões
POP	Procedimento Operacional Padrão

Rapid-I	Dispositivo fechado de vitrificação de alta segurança (High Security Vitrification)
RT	Responsável Técnico
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA)
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido Sintético de Oviduto (Synthetic Oviduct Fluid)
SR1	Solução de Reaquecimento 1: HM + 0,25 M sacarose 38 °C 5 min
SR2	Solução de Reaquecimento 2: HM + 0,15 M sacarose 38 °C 5 min
SV1-CT	Solução de Pré-equilíbrio Cryotop: HM + 7,5% EG + 7,5% DMSO 38 °C 3 min
SV1-OPS	Solução de Pré-equilíbrio OPS: HM + 10% EG + 10% DMSO 38 °C 1 min ± 10 s
SV2-CT	Solução de Vitrificação Cryotop: HM + 15% EG + 15% DMSO + 0,5 M sacarose T.A. 45–60 s
SV2-OPS	Solução de Vitrificação OPS: HM + 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose T.A. ≤ 20 s
T.A.	Temperatura Ambiente
TE	Transferência de Embriões
TCM-199	Tissue Culture Medium 199 — meio de maturação in vitro
VD	Vitrificação Direta (Protocolo Embrapa)

VG	Vesícula Germinativa (estágio imaturo do oócito)
VGBD	Quebra da Vesícula Germinativa (Germinal Vesicle Breakdown)
VS	Solução de Vitrificação (Vitrification Solution)
VT	Vitrificação
ZP	Zona Pelúcida

1 Contexto e justificativa

Por que criopreservar embriões bovinos?

O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do planeta e consolidou-se como o maior transferidor de embriões bovinos do mundo (IETS, 2023). Essa posição impõe demanda crescente por técnicas de criopreservação eficientes e padronizadas. Antes da criopreservação, os embriões precisavam ser transferidos imediatamente após a coleta. Com o armazenamento a -196°C em nitrogênio líquido, a transferência de embriões ganhou escala comercial e alcance global.

O que a criopreservação viabiliza na prática?

1. Transporte de embriões sem perda de viabilidade
2. Comercialização de material genético superior em escala nacional e internacional
3. Constituição de bancos genéticos para conservar raças ameaçadas de extinção
4. Acúmulo e distribuição de lotes sincronizados com a disponibilidade de receptoras

O número real de transferências no Brasil supera em mais de 119% o volume oficialmente registrado: evidência do dinamismo real do setor (IETS, 2023).



Fonte: Canal Rural

As duas técnicas centrais deste trabalho:**VITRIFICAÇÃO****PRINCÍPIO**

- Solidificação ultra-rápida sem formação de cristais de gelo
- Usa altas concentrações de crioprotetores (EG, DMSO, glicerol)
- Resfriamento: -196°C em nitrogênio líquido

ESPECIFICIDADES

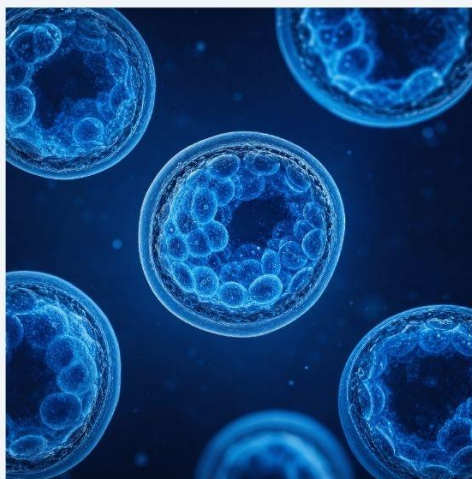
- Embriões devem estar no estágio ideal (blastocisto expandido)
- Tempo de exposição ao crioprotetor é crítico
- Sistemas: palheta aberta (OPS), Cryotop, Cryoloop
- Aquecimento rápido é obrigatório para evitar recristalização

DIRECT TRANSFER**PRINCÍPIO**

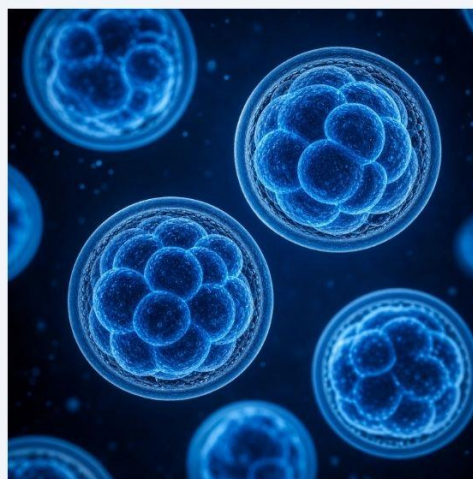
- Transferência do embrião sem descongelamento prévio em laboratório
- O embrião é aquecido na palheta, através de banho maria.

ESPECIFICIDADES

- Meio de diluição do Etilenoglicol já está dentro da própria palheta (colunas separadas)
- Padrão de envase: sistema de 3 ou 4 colunas na palheta
- Muito utilizado em programas de IATF em larga escala no Brasil



Fonte: Imagem criada com o uso de IA



Fonte: Imagem criada com o uso de IA

2 Fundamentos criobiológicos

Os três riscos do congelamento

Para entender por que cada passo dos protocolos existe, é preciso conhecer os três riscos biológicos centrais do congelamento. Eles justificam cada detalhe das técnicas: da escolha do crioprotetor à velocidade de aquecimento.

1 Cristais de gelo intracelulares

A água dentro da célula solidifica formando cristais irregulares que perfuram membranas, organelas e citoesqueleto, dano mecânico direto e irreversível.

Resposta dos protocolos: Vitrificação elimina cristais completamente ($>20.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Congelamento lento desidrata a célula antes de cristalizar.

2 Efeito solução (danos osmóticos)

O gelo extracelular concentra solutos, criando gradiente que drena a água da célula. Rápido demais = gelo intracelular. Lento demais = desidratação excessiva.

Resposta dos protocolos: Crioprotetores substituem a água intracelular e a velocidade de resfriamento é calibrada para cada tipo de embrião.

3 Recristalização no aquecimento

Cristais formados no congelamento crescem na faixa de -130°C a -60°C durante o aquecimento, causando novos danos em células que já sobreviveram ao resfriamento.

Resposta dos protocolos: Aquecimento ultrarrápido (imersão direta a $37-39^{\circ}\text{C}$) atravessa a faixa crítica antes que os cristais cresçam.

Princípio central: substituir a água intracelular por crioprotetores antes do congelamento minimiza simultaneamente os danos osmóticos e a formação de cristais.

Equilíbrio de dois fatores

A criobiologia busca sempre equilibrar dois riscos opostos:

↑ concentração de CPA → ↓ cristalização, mas ↑ toxicidade química

↓ concentração de CPA → ↓ toxicidade, mas ↑ risco de cristalização



Fonte: Imagem criada com o uso de IA

3 Produção in vitro de embriões (PIVE)

O que é a PIVE?

A PIVE é o conjunto de biotecnologias que permite a obtenção de embriões fora do organismo materno, a partir da colheita de oócitos imaturos, sua maturação, fertilização e cultivo in vitro até o estágio de transferência.

Diferentemente da Transferência de Embriões (TE) convencional, a PIVE independe da superovulação prévia da doadora, aproveitando o pool folicular presente nos ovários de fêmeas de alto valor genético, inclusive animais gestantes, em lactação ou abatidos.

65%

Da produção mundial de embriões bovinos via PIVE (IETS, 2023)

>600 mil

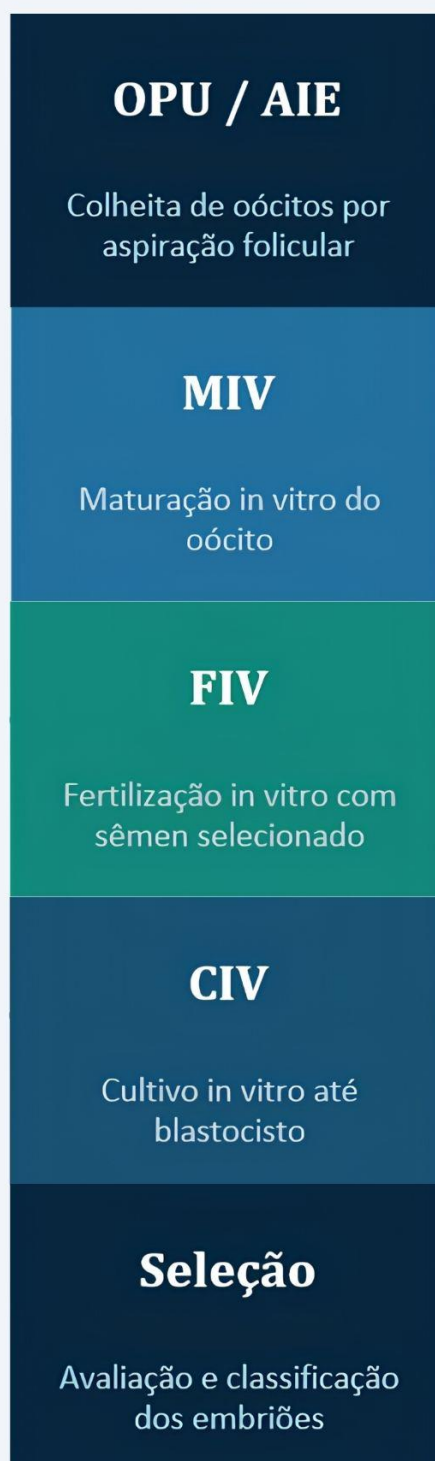
Embriões PIVE produzidos no Brasil em 2022

25 - 50%

Taxa média de blastocisto in vitro

CAPÍTULO 03 - Produção in vitro de embriões (PIVE)**Etapas da PIVE**

A PIVE é dividida em 5 fases:



CAPÍTULO 03 - Produção in vitro de embriões (PIVE)

Etapa 01 : OPU - Ovum Pick-up

Essa fase consiste em aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia

1 Procedimento

Realizada com agulha de aspiração acoplada a transdutor ultrassonográfico transvaginal. Uma agulha calibre 18–20G perfura a parede vaginal e aspira o conteúdo dos folículos antrais visíveis (≥ 3 mm), com vácuo entre 60–80 mmHg.

2 Frequência e sincronização

Sessões de OPU são realizadas 2× por semana, com intervalo de 3–4 dias. Protocolos com progesterona (CIDR) e FSH/LH podem elevar o número de CCOs por sessão.

3 Complexo cumulus-oócito

Unidade funcional coletada. CCOs de qualidade I e II (cumulus compacto e múltiplas camadas) apresentam maiores taxas de maturação e blastocisto in vitro.

4 Classificação dos CCOS

Grau I: ≥ 3 camadas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo. Grau II: cumulus incompleto, cytoplasma levemente granular. Grau III/IV: desnudos ou degenerados — descartados.

Etapa 02: MIV - Maturação In Vitro

Essa fase consiste na retomada da meiose e capacitação citoplasmática do oócito

Meio TCM-199 + BSA + FSH + LH +
EGF + 17 β -estradiol

38,5 °C · 5% CO₂ · 95% umidade ·
22–24 horas

Progressão: VG → VGBD → MI →
MII (oócito maduro)

Indicador: extrusão do 1º corpúsculo polar —
sinal de maturação nuclear

Por que a MIV é desafiadora?

- Oócitos imaturos (estágio VG) colhidos da AIE precisam completar a meiose fora do folículo
- Maturação citoplasmática (reorganização de organelas, reservas de mRNA) é igualmente essencial
- Taxas de maturação nuclear: 80–90%; taxas citoplasmáticas são menores e mais difíceis de aferir
- Suplementação com fatores de crescimento (IGF-1, EGF) melhora taxas de blastocisto

CAPÍTULO 03 - Produção in vitro de embriões (PIVE)

Etapa 03: FIV - Fertilização In Vitro

Essa fase consiste na capacitação espermática e fusão gamética em meio controlado

Preparo do sêmen

Sêmen congelado/descongelado é submetido a swim-up ou gradiente de Percoll para seleção dos espermatozoides com maior motilidade progressiva.

Capacitação espermática

Realizada com heparina (10 µg/mL) ou PHE (penicilamina + hipotaurina + epinefrina) por 15–30 min a 38,5 °C, desencadeando a reação acrossômica.

Co-incubação

CCOs maduros + espermatozoides ($1-2 \times 10^6$ spz/mL) em meio TALP-FERT ou SOF-FERT. Período: 18–20 horas, 38,5 °C, 5% CO₂.

Pontos críticos

- Taxa de polispermia elevada é o principal problema da FIV bovina (até 30%)
- Concentração espermática deve ser ajustada por touro — touros com alta capacidade fecundante usam menor concentração
- PHE reduz polispermia em relação à heparina

18 - 20h

Co-incubação

$1-2 \times 10^6$

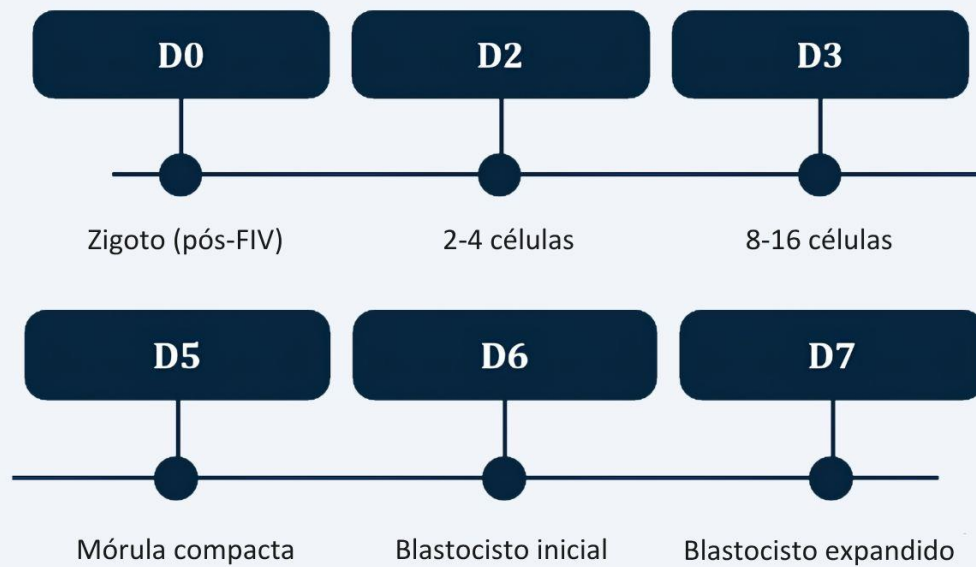
Sptz/ml FIV

30%

Polispermia

CAPÍTULO 03 - Produção in vitro de embriões (PIVE)**Etapa 04: CIV - Cultivo In Vitro**

Essa fase vai do zigoto ao blastocisto — 7 a 8 dias de desenvolvimento embrionário

**Meio de cultivo**

SOF (Synthetic Oviduct Fluid), CR1aa ou G-series.
Suplementados com BSA 4–8 mg/mL, aminoácidos,
vitaminas e antibióticos.

Condições gasosas

Sistema trigas: 5% O₂ + 5% CO₂ + 90% N₂ (hipóxia).
Trocas gasosas a cada 48–72h. Microgotas de 20–40
µL sob óleo mineral.

Co-cultivo

Células de granulosa ou tuba uterina (SOF-CF) auxiliam
no desenvolvimento embrionário secretando fatores
paracrinos e reduzindo metabólitos tóxicos.

CAPÍTULO 03 - Produção in vitro de embriões (PIVE)

Etapa 05: Seleção e Classificação

Essa fase consiste na avaliação morfológica dos embriões no D7–D8 pós-FIV

Sistema IETS de classificação

GRAU 1

Excelente/bom

Blastômeros uniformes, MCI proeminente, zona pelúcida íntegra

GRAU 2

Regular

Pequenas irregularidades, MCI moderada, $\leq 20\%$ extrusão citoplasmática

GRAU 3

Ruim

Irregularidades graves, MCI fragmentada, $> 20\%$ extrusão

GRAU 4

Degenerado

Massa celular indiferenciada — descartado para inovulação

Estágios Morfológicos

1–3

Clivagem (2–16 células)

4

Mórula compacta

5

Blastocisto inicial

6

Blastocisto

7

Blastocisto expandido

8

Blastocisto eclodido

4 Crioprotetores (CPAs)

Dois grupos com mecanismos complementares

Os CPAs (Cryoprotective Agents) reduzem os danos causados pelo congelamento e são divididos em dois grupos:

Permeantes (intracelulares)

- EG (Etilenoglicol) — padrão no DT e vitrificação
- DMSO — combinado com EG na vitrificação
- Glicerol — requer remoção obrigatória antes da inoculação
- DMF — usado em protocolos específicos

Atravessam a membrana, substituem a água, reduzem o ponto de congelamento e aumentam a viscosidade intracelular.

Não permeantes (extracelulares)

- Sacarose — reidratação gradual (0,5M → 0,25M → 0M)
- Trealose — estabilização de membrana
- BSA / SFB — proteção durante manipulação

Ficam no espaço extracelular, promovem saída controlada de água por osmose e estabilizam a membrana plasmática.

Por que o EG domina o Direct Transfer?

- 01** Baixo peso molecular (62 g/mol) — alta velocidade de permeação celular, superior ao glicerol (92 g/mol).
- 02** Menor toxicidade endometrial — tolerado pelo trato reprodutivo bovino nas concentrações de uso (1,4–1,8 M).
- 03** Alta solubilidade em água — homogeneidade da solução garantida.

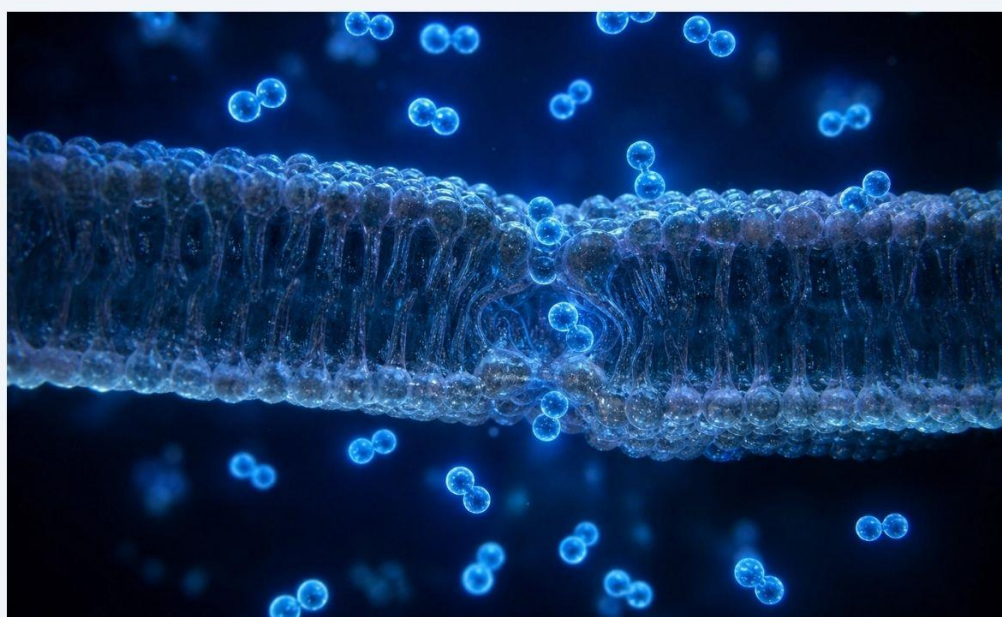
O glicerol é INCOMPATÍVEL com o Direct Transfer: tóxico ao endométrio bovino nas concentrações necessárias ao congelamento. Exige remoção obrigatória em bancada antes da inovulação.

Mecanismo de ação

- Substituição da água: CPAs penetrantes ocupam o espaço intracelular reduzindo água disponível para cristalizar
- Efeito coligativo: rebaixam o ponto de fusão/congelamento da solução
- Aumento de viscosidade: dificultam a mobilidade molecular necessária para formação de cristais
- Estabilização de membrana: alguns CPAs interagem diretamente com fosfolipídios
- Desidratação osmótica prévia (não penetrantes): retiram água da célula antes do resfriamento

Soluções comerciais comuns

- VS1/VS2 (Vajta): EG + DMSO + sacarose — base de muitos protocolos OPS
- Cryotop solution (Kitazato): EG + DMSO em formulação própria
- Ethylene glycol-based straws: formulações para Direct Transfer com glicerol



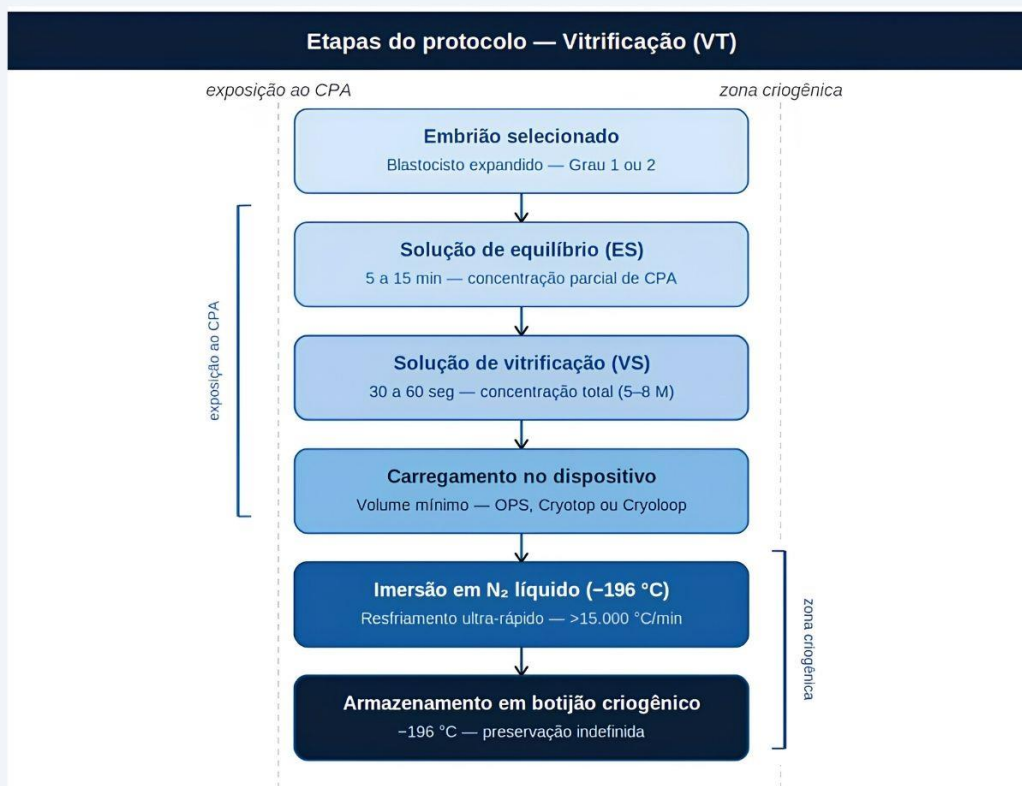
Fonte: Imagem criada com o uso de IA

5 Vitrificação (VT)

O que é vitrificação?

Solidificação ultrarrápida de uma solução altamente concentrada de crioprotetores, resultando em estado amorfo (vítreo): sem formação de nenhum cristal de gelo, intra ou extracelular. Descrita por Rall & Fahy (1985); aplicada comercialmente em bovinos com a OPS (Vajta *et al.*, 1998) e Cryotop (Kuwayama *et al.*, 2005).

Etapas do protocolo



Fonte: Imagem criada com o uso de IA

CAPÍTULO 05- Vitrificação (VT)



Fonte: Imagem criada com o uso de IA

CAPÍTULO 05- Vitrificação (VT)

As duas etapas críticas do protocolo

SV1 — Equilíbrio

Composição: EG 10% + DMSO 10% + SFB 5–10%**Tempo/Temp:** 1–3 min · 38–39°C

Permeação parcial: crioprotetor entra, água sai. A temperatura elevada aumenta a fluidez da membrana e acelera a permeação.

SV2 — Vitrificação

Composição: EG 20% + DMSO 20% + Sacarose 0,5M**Tempo/Temp:** 20–30 seg máximo

Permeação máxima para estado vítreo. CRONÔMETRO É OBRIGATÓRIO. Após o tempo: imersão imediata no NL₂ sem qualquer pausa.

Imersão no NL₂ deve ocorrer em menos de 60 segundos após contato com SV2. Prepare dispositivo e nitrogênio ANTES de iniciar a SV2.

Dispositivos e taxas de resfriamento

Dispositivo	Taxa (°C/min)	Tipo	Quando usar
Palheta 0,25 mL	~2.500	Fechado	Exige maior concentração de CPA. Compatível com inovuladores convencionais.
OPS	>20.000	Aberto	Padrão comercial no Brasil para PIVE. Volume < 1 µL, parede ~0,07 mm.
Cryotop	>23.000	Aberto	Alta performance para oócitos e PIVE. Capa protetora incluída.
HSV / Rapid-I	<OPS	Fechado	Exportação e bancos de germoplasma. Elimina contato com NL ₂ .

6 Direct transfer (DT)

O que é o Direct Transfer?

Técnica em que o embrião é descongelado na própria palheta e inoculado diretamente na receptora, sem nenhuma etapa de remoção do crioprotetor em bancada laboratorial. Possível graças ao EG, que é tolerado pelo endométrio bovino nas concentrações de uso (1,4–1,8 M). Descrito por Leibo (1984) e aperfeiçoado por Dochi *et al.* (1995).

Vantagens práticas: por que o DT domina o campo

- ✓ Sem remoção de crioprotetor, sem laboratório no local de transferência
- ✓ Redução drástica de pontos de falha durante o processamento pós-descongelamento
- ✓ O embrião permanece na mesma palheta do laboratório até a inovulação, rastreabilidade superior
- ✓ Menor variabilidade entre técnicos de campo pela simplificação do protocolo
- ✓ Custo operacional reduzido, sem reagentes de remoção nem equipamentos de aquecimento no campo

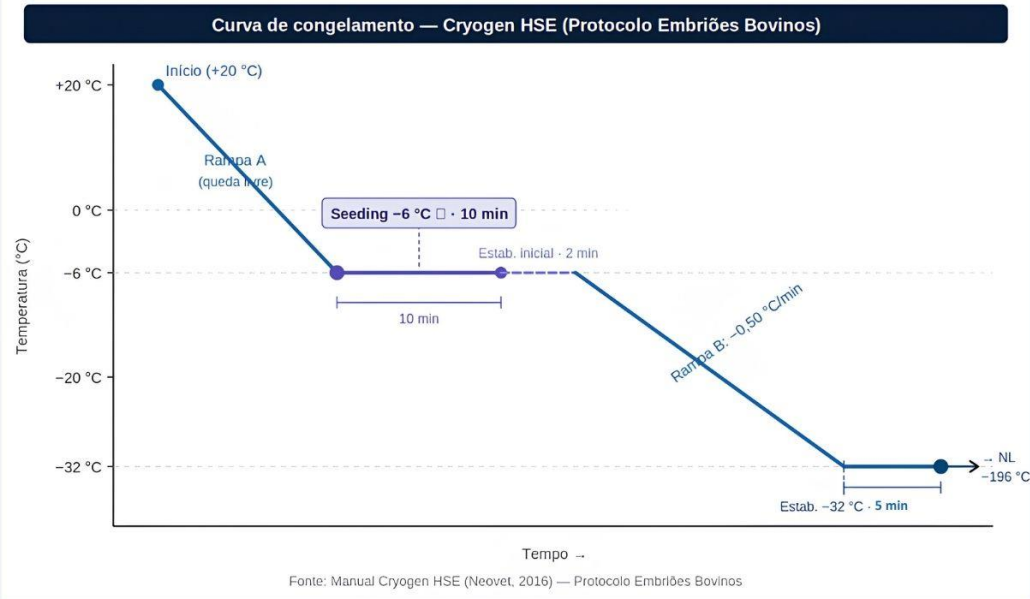
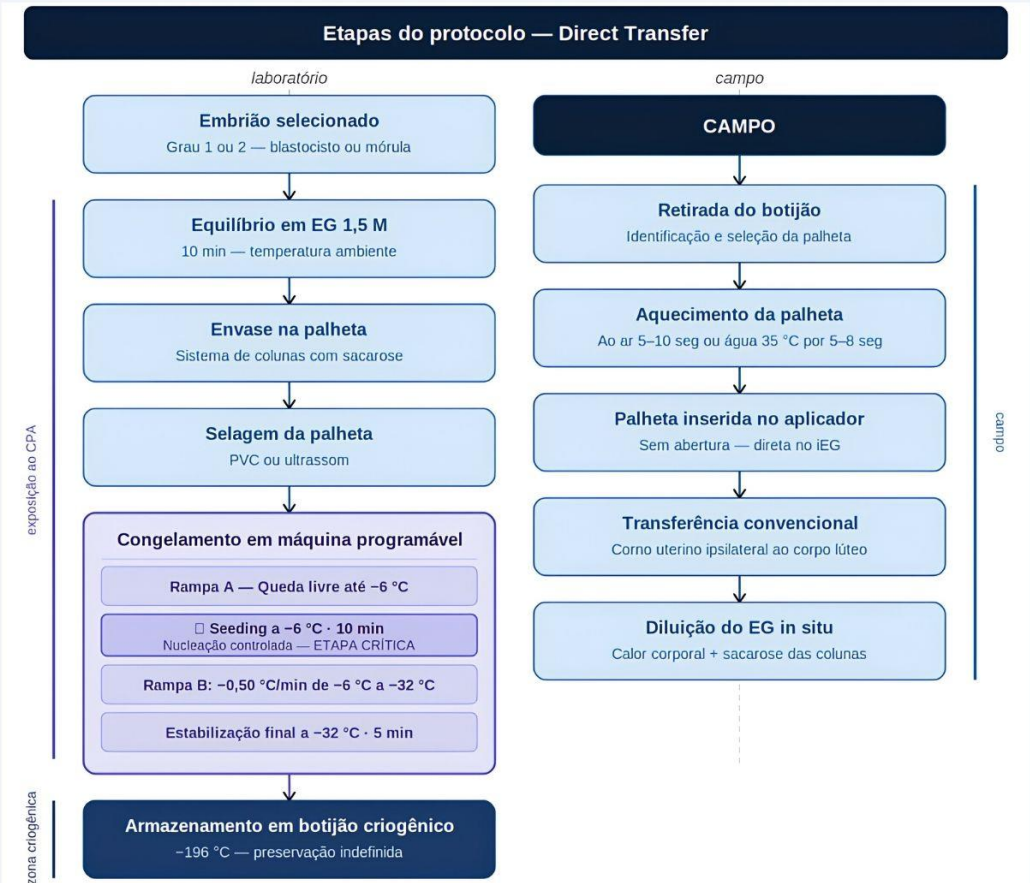
Protocolo clássico: arranjo da palheta

Meio	EG + embrião	Meio
------	--------------	------

- 1** Seleção: Grau 1–2, preferencialmente blastocisto expandido (estágio 7)
- 2** Equilíbrio gradual: EG 0,5M × 5 min → EG 1,0M × 5 min
- 3** Carregamento na palheta com EG 1,4–1,8M (± sacarose 0,1–0,25M)
- 4** Congelamento: –0,3 a –0,5°C/min até –7°C
- 5** **Seeding a –7°C — manual ou automático (etapa crítica)**
- 6** –0,3°C/min até –35°C → imersão em NL₂ a –196°C

CAPÍTULO 06- Direct Transfer (DT)

Etapas do protocolo



7 Vitrificação X Direct transfer

Como escolher?

Vitrificação e DT não são técnicas concorrentes — são complementares. A escolha correta depende do tipo de embrião, da infraestrutura disponível e do objetivo do programa.

Critério	Vitrificação	Direct Transfer
Embrião ideal	PIVE/In vivo	In vivo/PIVE (conv.)
Proteção contra cristais	Total — estado vítreo	Parcial — cristais extracelulares controlados
Sem laboratório no campo	Não — requer reaquecimento	Sim — só NL ₂ e inovulador
Complexidade técnica	Maior	Menor
Prenhez Grau I in vivo	54–65%	54–69%
Prenhez PIVE	25–50% (até 33% Embrapa VD)	20–35% (convencional)
Exportação / germoplasma	Preferencial (dispositivos fechados)	Compatível com normas sanitárias
Custo operacional campo	Maior	Menor
Para PIVE → Vitrifificação. Para in vivo em campo → DT. Para PIVE em campo com praticidade → Protocolo Embrapa VD.		

Diretrizes de seleção rápida

Use Vitrifificação quando	Use Direct Transfer quando
— Embriões PIVE — Laboratório com infraestrutura completa — Exportação ou banco de germoplasma — Maximizar taxa de prenhez	— Embriões in vivo por superovulação — Programa em campo sem laboratório — Logística para múltiplas propriedades — Custo operacional é fator limitante

8 Boas práticas e erros comuns

A padronização dos procedimentos operacionais é o fator mais determinante para a reprodutibilidade dos resultados, mais do que a escolha entre as técnicas em si.

Condições essenciais de laboratório e NL_2

- Temperatura ambiente 20–25°C e ausência de correntes de ar durante a manipulação
- Placa aquecida calibrada a 38–39°C com termômetro de referência, $\pm 2^\circ C$ já compromete resultados
- Nível de NL_2 sempre acima do mínimo; sensores automáticos com alarme em grandes centrais
- EPI obrigatório: luvas criogênicas, óculos e avental. Detectores de O_2 em salas com NL_2
- Organização do tanque: Tanque $\rightarrow$ Canister $\rightarrow$ Gobelet $\rightarrow$ Palheta, com registro em planilha



Fonte: Imagem criada com o uso de IA

CAPÍTULO 08- Boas práticas e erros comuns

Erros críticos e como evitá-los

	Erro	Consequência	Prevenção
VT	Tempo excessivo na SV2	Toxicidade irreversível, embrião parece normal mas não se desenvolve	Cronômetro de precisão. Nunca ultrapasse o tempo protocolado.
VT	Palheta exposta ao ar no tanque	Recristalização silenciosa, dano invisível	Pinças pré-resfriadas. Planejar busca antes de abrir o tanque.
DT	Falha no seeding a -7°C	Superesfriamento, cristalização explosiva	Verificar programação da máquina antes de cada uso.
DT	Curva de resfriamento incorreta	Cristalização intracelular ou dano osmótico	Calibrar máquina periodicamente + termômetro externo.
Ambas	Identificação errada das palhetas	Rastreabilidade comprometida, genética incorreta	Checklist duplo antes de congelar. Seguir POPs.

POPs (Procedimentos Operacionais Padrão) são a principal ferramenta de prevenção de erros: reduzem dependência de memória individual e são exigidos pela Portaria SDA/MAPA nº 1.204/2024.

9 Procedimento operacional padrão

I. IDENTIFICAÇÃO

Campo	Informação
Nome do Processo	Vitrificação e Direct Transfer de Embriões Bovinos
Código	CRYO-01
Versão	01
Unidade Responsável	Laboratório de Reprodução Animal
Subunidade	Setor de Criopreservação Embrionária
Data de Elaboração	[Inserir data]
Data de Vigência	[Inserir data]
Próxima Revisão	[Inserir data — máximo 12 meses após vigência]
Elaborado por	[Nome do responsável técnico]
Aprovado por	[Nome do aprovador]

II. PÚBLICO-ALVO

Médicos Veterinários responsáveis pela execução e supervisão dos procedimentos de criopreservação embrionária bovina.

Biólogos e técnicos de laboratório atuantes no setor de criopreservação de embriões.

Graduandos e pós-graduandos em Medicina Veterinária, Zootecnia e áreas afins em estágio supervisionado.

Pesquisadores e professores que utilizam as instalações para fins didáticos e científicos.

PRÉ-REQUISITO

Conhecimento de biologia embrionária bovina, manejo de nitrogênio líquido, uso de microscópio estereoscópio e micropipetas. Executores sem experiência prévia devem ser supervisionados por profissional habilitado até demonstrar competência nas etapas críticas.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

III. O QUE É ESTE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO?

Este POP descreve os dois protocolos de criopreservação de embriões bovinos utilizados neste laboratório: Vitrificação e Direct Transfer. Diferem na composição das soluções crioprotetoras, nos dispositivos de envase e no protocolo de reaquecimento.

VITRIFICAÇÃO	DIRECT TRANSFER (DT)
■ Solidificação ultrarápida com EG + DMSO + sacarose ■ Dispositivos: OPS (~2.500 °C/min) ou Cryotop (~23.000 °C/min) ■ Estado vítreo — zero cristais de gelo ■ Reaquecimento exige laboratório (SR1 → SR2)	■ Palheta convencional 0,25 mL com EG como único permeável ■ Sistema de colunas: HM ar EG+embrião ar HM ■ Diluição do crioprotetor dentro da palheta no reaquecimento ■ Ideal para campo — sem etapa laboratorial

Este POP NÃO abrange: coleta de embriões, superovulação, PIVE nem o protocolo de inovulação. Estes são objetos de POPs específicos.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: Padronizar os procedimentos laboratoriais de criopreservação de embriões bovinos pelos métodos de Vitrificação (OPS e Cryotop) e Direct Transfer, garantindo viabilidade embrionária pós-reaquecimento, biossegurança dos profissionais e rastreabilidade do processo.

01. Estabelecer critérios morfológicos IETS de seleção dos embriões aptos a cada protocolo.	02. Definir composição, volumes e temperaturas de todas as soluções (SV1, SV2, SR1, SR2, Sol. DT).
03. Detalhar confecção das palhetas OPS e parâmetros de uso do Cryotop, com tempos críticos de exposição.	04. Descrever o protocolo completo de Direct Transfer, incluindo sistema de colunas e reaquecimento.
05. Orientar a escolha justificada do protocolo conforme o tipo de embrião e infraestrutura disponível.	06. Normatizar o armazenamento, a identificação e o controle de estoque criogênico.
07. Estabelecer indicadores de desempenho e metas mínimas aceitáveis por protocolo.	08. Definir EPIs, medidas de biossegurança e sistema de registro de ocorrências.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

V. BASES LEGAIS

Base Legal	Descrição / Aplicabilidade
Resolução CFMV nº 1.236/2018	Regulamenta a atuação do MV em biotécnicas reprodutivas, incluindo criopreservação de embriões.
IN MAPA nº 48/2016	Requisitos técnicos para uso e armazenamento de material genético animal em laboratórios habilitados.
Lei Federal nº 5.517/1968	Dispõe sobre o exercício da profissão de Médico Veterinário, regulamentada pelo CFMV.
NR-9 (MTE)	Programa de Prevenção de Riscos Ambientais — riscos químicos (DMSO, EG) e físicos (criogenia).
NR-32 (MTE)	Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde — substâncias criogênicas e químicas.
IETS Manual 4ª Ed.	Norma internacional para avaliação, criopreservação e manipulação de embriões bovinos.
WOAH/OIE Código Sanitário	Normas de sanidade animal para rastreabilidade e transporte de embriões bovinos.
VOELKEL & HU (1992)	Publicação de referência do protocolo Direct Transfer com EG em palheta convencional.
PHILLIPS & JAHNKE (2016)	Atualização técnica do protocolo DT com etilenoglicol para embriões bovinos.

VI. RESPONSABILIDADES

Responsável	Atribuições
Médico Veterinário RT	Supervisionar/executar todos os procedimentos; autorizar início de cada sessão; assinar registros; responsabilizar-se pela qualidade do material criopreservado.
Técnico de laboratório	Executar etapas de preparo de soluções e criopreservação; manter planilhas atualizadas; verificar equipamentos antes de cada procedimento.
Alunos / Estagiários	Realizar procedimentos somente sob supervisão direta; não iniciar etapas críticas sem autorização; participar dos treinamentos obrigatoriamente.
Responsável pelo estoque	Controlar entrada, saída e descarte de dispositivos; verificar validade dos reagentes; reabastecer NL; manter planilha de estoque atualizada.
Responsável pela biossegurança	Garantir disponibilidade de EPI; conduzir treinamentos de segurança com NL; inspecionar extintores e saídas de emergência.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

VII. DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Termo	Definição
POP	Procedimento Operacional Padrão
Vitrificação	Criopreservação ultrarápida com EG + DMSO + sacarose via OPS ou Cryotop; solidificação em estado vítreo sem cristais de gelo
Direct Transfer (DT)	Criopreservação em palheta 0,25 mL com EG e sistema de colunas; permite reaquecimento a campo sem laboratório
OPS	Open Pulled Straw — palheta estirada artesanalmente (~100–150 µm de Ø interno); taxa ~2.500 °C/min
Cryotop	Dispositivo comercial com película ultrafina (< 0,1 µL); taxa de resfriamento ~23.000 °C/min
EG	Etilenoglicol — crioprotetor permeável principal nos três protocolos
DMSO	Dimetilsulfóxido — crioprotetor permeável complementar; usado na VT OPS e Cryotop; ausente no DT
Sacarose	Osmoprotetor não permeável: SV2 (0,5 M); SR1 (0,25 M); SR2 (0,15 M). Ausente ou opcional no DT
NL	Nitrogênio líquido (-196 °C)
HM	Holding Medium — PBS + 5% SFB; meio de manutenção a 38 °C
SV1-OPS	Pré-equilíbrio OPS: HM + 10% EG + 10% DMSO 38 °C 1 min ± 10 s
SV2-OPS	Vitrificação OPS: HM + 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose T.A. ≤ 20 s
SV1-CT	Pré-equilíbrio Cryotop: HM + 7,5% EG + 7,5% DMSO 38 °C 3 min
SV2-CT	Vitrificação Cryotop: HM + 15% EG + 15% DMSO + 0,5 M sacarose T.A. 45–60 s
SR1	Reaquecimento 1: HM + 0,25 M sacarose 38 °C 5 min
SR2	Reaquecimento 2: HM + 0,15 M sacarose 38 °C 5 min
Sol. DT	EG 1,5 M ou 1,4 M + 0,15 M sacarose em PBS; coluna central da palheta DT
Sistema colunas DT	HM bolha de ar EG+embrião bolha de ar HM — permite diluição in-straw
PBS / SFB	Phosphate Buffered Saline / Soro fetal bovino
Bx / PIVE / EPI / IETS	Blastocisto expandido / Produção In Vitro de Embriões / EPI / Intl. Embryo Technology Society

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

VIII. MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

MATERIAIS DE CONSUMO	REAGENTES
Palhetas OPS 0,25 mL — vitrificação Kit Cryotop (Kitazato® ou equiv.) — vitrificação Palhetas convencionais 0,25 mL — DT Capilares de vidro finos — depósito Cryotop Lacradores coloridos para palheta Placas de Petri 35 mm e 60 mm Tubos Falcon 15 mL e 50 mL Micropipetas monocanal 200 µL e 1000 µL Goblets e canisters de identificação EPI completo (luvas criogênicas, óculos, jaleco, calçado fechado) Caneta permanente criogênica / etiquetas crio-resistentes	PBS (Dulbecco's) — base de todas as soluções SFB certificado (BSE-livre) — 5% em HM Etilenoglicol (EG) — crioprotetor principal DMSO — complementar (ausente no DT) Sacarose grau analítico — osmoprotetor Água ultrapura / osmose reversa Álcool 70° — desinfecção de bancadas
EQUIPAMENTOS	
Microscópio estereoscópio + mesa aquecida 38 °C Botijão de NL (mínimo 10 L) Banho-maria digital 38 °C Cronômetro (obrigatório — tempos críticos)	

IX. ORIENTAÇÕES GERAIS E EPI

EPI	Obrigatoriedade
Jaleco de manga longa	Obrigatório em todas as etapas laboratoriais.
Luvas de procedimento	Obrigatórias para toda manipulação laboratorial.
Luvas criogênicas reforçadas	Obrigatórias ao manusear o botijão de NL.
Óculos de proteção	Obrigatórios ao abrir o botijão.
Calçado fechado	Obrigatório. Sapatos abertos são proibidos.

SEGURANÇA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO

NL causa queimaduras criogênicas graves — uso de EPI é inegociável em todas as etapas.

Trabalhar exclusivamente em ambiente ventilado (NL desloca o O₂ do ar).

Nunca selar hermeticamente palhetas imersas em NL — risco de explosão.

Contato com pele: irrigar com água morna por ≥ 15 min; não friccionar; acionar médico imediatamente.

Extintor de CO₂ ou pó químico: visível, sinalizado e acessível no laboratório.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

X. SELEÇÃO DE EMBRIÕES E ESCOLHA DO PROTOCOLO

Classificação IETS	Critério morfológico	Indicação
Grau I – Excelente	Simétrico, blastômeros uniformes	Todos os protocolos
Grau II – Bom	10–25% de células comprometidas	Todos
Grau III – Regular	25–50% de células comprometidas	NÃO indicado
Grau IV – Pobre	> 50% de células comprometidas	CONTRAINDICADO — descartar

ORIENTAÇÃO PARA ESCOLHA DO PROTOCOLO

In vivo Grau I — campo sem infraestrutura	Direct Transfer (DT)
In vivo Grau I — laboratório equipado	OPS ou DT
In vitro PIVE — qualquer grau indicado	Cryotop preferencial
Grau II — maior susceptibilidade criogênica	Cryotop ou OPS. Evitar DT quando possível
Laboratório de pesquisa / alta tecnologia	Cryotop — melhor padronização

X.4 – VITRIFICAÇÃO: MÉTODO OPS — Soluções e Confecção

Solução	Composição	Temperatura	Tempo de
HM	PBS + 5% SFB	38 °C	Pré-aquecido
SV1-OPS	HM + 10% EG + 10% DMSO	38 °C	1 min ± 10 s
SV2-OPS	HM + 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M	T.A. 20–25 °C	≤ 20 s ⚠
SR1	HM + 0,25 M sacarose	38 °C	5 min
SR2	HM + 0,15 M sacarose	38 °C	5 min

CONFECCÃO DAS PALHETAS OPS

1. Aproximar extremidade da palheta 0,25 mL da chama (3–5 cm), girando 5–8 s até amolecer.
2. Estirar suavemente até ~100–150 µm de diâmetro interno. Cortar com tesoura reta (~2 cm de região estirada).
3. Fabricar imediatamente antes do uso — nunca reutilizar.
4. Inspeccionar ao estereoscópio: descartar OPS com dobras, rupturas ou diâmetro irregular.

ATENÇÃO: Tempo máximo na SV2-OPS = 20 segundos. Cronometrar sem exceção.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

X.4 – VITRIFICAÇÃO OPS: Etapas do Procedimento

Etapa	Descrição	Tempo
1	Transferir embrião (Grau I/II) para gota de HM 38 °C.	Imediato
2	2 lavagens em HM (38 °C). Remove resíduos do meio.	~1 min
3	Transferir para SV1-OPS (38 °C).Retração + re-expansão osmótica.	1 min ± 10 s
4	Posicionar OPS sobre gota de SV2-OPS.	Preparação
5	Transferir embrião para SV2-OPS e aspirar com a OPS (1–2 µL).	t = 0 s
6	Mergulhar a OPS no NL (-196 °C), posição horizontal. ≤ 20 s do t=0	≤ 20 s
7	Manter submersa por no mínimo 30 s.	≥ 30 s
8	Dentro do NL, fixar no goblet identificado, transferir para canister.	< 5 s fora NL
9	Registrar: código, data, raça/ID doadora, estágio, grau IETS, lote, técnico.	Imediato

X.5 – VITRIFICAÇÃO: MÉTODO CRYOTOP

Solução	Composição	Temperatura	Tempo de
HM	PBS + 5% SFB	38 °C	Pré-aquecido
SV1-CT	HM + 7,5% EG + 7,5% DMSO	38 °C	3 min exatos
SV2-CT	HM + 15% EG + 15% DMSO + 0,5 M	T.A. 20–25 °C	45–60 s
SR1	HM + 0,25 M sacarose	38 °C	5 min
SR2	HM + 0,15 M sacarose	38 °C	5 min

ETAPAS DO PROCEDIMENTO CRYOTOP

1	Transferir embrião para HM 38 °C. Confirmar ID.	Imediato
2	2 lavagens em HM (38 °C).	~1 min
3	Transferir para SV1-CT (38 °C). Observar retração e re-expansão.	3 min exatos
4	Transferir para SV2-CT. INÍCIO DO TEMPO CRÍTICO.	t = 0 s
5	Depositar embrião na película com capilar em volume < 0,1 µL.	45–60 s ⚠
6	Mergulhar película no NL (-196 °C), película voltada para baixo.	< 1 s
7	Encaixar tampa protetora dentro do NL → goblet → canister.	Imediato
8	Registrar: código, data, raça/ID, estágio, grau IETS, lote, técnico.	Imediato

ATENÇÃO: Cryotop — tempo máximo SV2-CT = 60 s; volume na película < 0,1 µL.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

X.6 – DIRECT TRANSFER: Soluções e Sistema de Colunas

Criopreservação com EG como único crioprotetor permeável. A diluição ocorre dentro da própria palheta durante o reaquecimento a 20–25 °C por 5–10 s, eliminando qualquer etapa laboratorial a campo.

Protocolo	Composição	
Protocolo 1 (Voelkel &	EG 1,5 M em PBS	
Protocolo 2 (variante)	EG 1,4 M + 0,15 M sacarose em	
HM (colunas externas)	PBS + 5% SFB	
CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE COLUNAS — PALHETA 0,25 mL		
Coluna 1 HM ~75 µL	ar 10 mm	Coluna 2 EG+embrião ~ 25 µL

← extremidade posterior (lacrador) extremidade anterior (inovulador) →

PRINCÍPIO DO REAQUECIMENTO in-straw: ao aquecer a palheta em banho-maria a 20–25 °C por 5–10 s, as moléculas de água das colunas externas de HM difundem-se osmoticamente para a coluna central de EG, diluindo o crioprotetor dentro da palheta. O embrião é reidratado sem sair da palheta — que vai diretamente para o inovulador.

X.6 – DIRECT TRANSFER: Etapas do Procedimento

Eta	Descrição	Tempo
1	Selecionar embrião (Grau I obrigatório).	Obrigatório
2	3 lavagens em HM (38 °C) para remover resíduos.	~1–2 min
3	Palheta: Coluna 1 (HM ~75 µL) + bolha 1 + Coluna 2 (Sol. DT ~20 µL)	Preparação
4	Transferir embrião para ~5 µL de Sol. DT em placa de Petri.	< 30 s no EG
5	Aspirar embrião + Sol. DT → completar Coluna 2. INÍCIO t=0.	t = 0 s
6	Criar bolha 2 (~10 mm) + Coluna 3 (HM ~75 µL).	< 2 min do t=0
7	Lacrar extremidade posterior. Verificar posição ao	Antes de imergir
8	Mergulhar palheta em NL (-196 °C), posição horizontal.	< 4 min do t=0
9	Fixar no goblet identificado → canister. Registrar.	Imediato
ATENÇÃO: Tempo total de exposição ao EG (t=0 → imersão em NL) não deve ultrapassar 4 minutos.		

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

X.7 / X.8 – REAQUECIMENTO: VT (OPS/Cryotop) e Direct Transfer

REAQUECIMENTO — VITRIFICAÇÃO (OPS / CRYOTOP)		
R1	Retirar OPS/Cryotop do botijão com pinça longa. Confirmar ID.	Dentro do NL
R2	OPS: banho-maria 25 °C/10 s ou 37 °C/5–7 s. Cryotop: depositar SR1 (38 °C) sobre película.	10 s
R3	Transferir embrião para SR1 (HM + 0,25 M sacarose, 38 °C). Observar re-expansão.	5 min
R4	Transferir para SR2 (HM + 0,15 M sacarose, 38 °C). Diluição progressiva.	5 min
R5	Transferir para HM puro (38 °C). Lavagem final e equilíbrio completo.	5 min
R6	Avaliar: re-expansão da blastocela + integridade da ZP. Apto → prosseguir. Inapto → descartar.	Obrigatório

REAQUECIMENTO — DIRECT TRANSFER		
R1	Retirar palheta DT do botijão com pinça longa. Confirmar ID.	Dentro do NL
R2	Mergulhar em água 20–25 °C por 5–10 s. O HM das colunas externas dilui o EG dentro da palheta.	5–10 s
R3	Enxugar exterior com papel toalha. Palheta pronta: embrião reidratado, EG diluído.	Imediato
R4	Palheta vai diretamente para o inovulador. Sem etapas laboratoriais.	→ inovulador

XI / XII – RESULTADOS ESPERADOS E MONITORAMENTO

Indicador de Desempenho	Meta Aceitável
Sobrevivência pós-reaquecimento — OPS	≥ 70% (re-expansão + ZP)
Sobrevivência pós-reaquecimento — Cryotop	≥ 80% (morfologia preservada)
Sobrevivência pós-reaquecimento — DT	≥ 65% (re-expansão observável)
Integridade da ZP (OPS e Cryotop)	≥ 85% dos dispositivos
Rastreabilidade dos dispositivos em estoque	100% identificados e
Conformidade das soluções	100% preparadas no dia,
Perda por armazenamento inadequado	Meta: 0%

MONITORAMENTO — FREQUÊNCIAS	
Mesa aquecedora	Diariamente antes de procedimentos. 38 ± 0,5 °C.
Banho-maria	Antes de cada sessão de reaquecimento. 38 ± 0,5 °C.
Nível de NL	Semanalmente; reabastecer ao atingir 50%.
Calibração micropipetas	A cada 3 meses ou suspeita de desvio.
Validade dos reagentes	Antes de cada uso; descartar lotes vencidos.

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

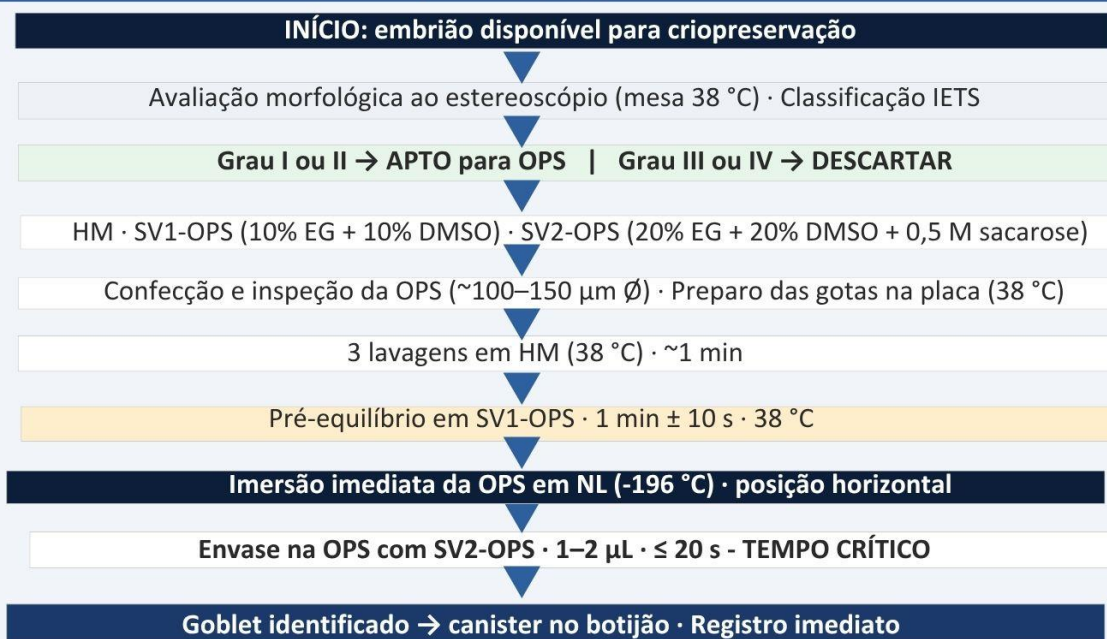
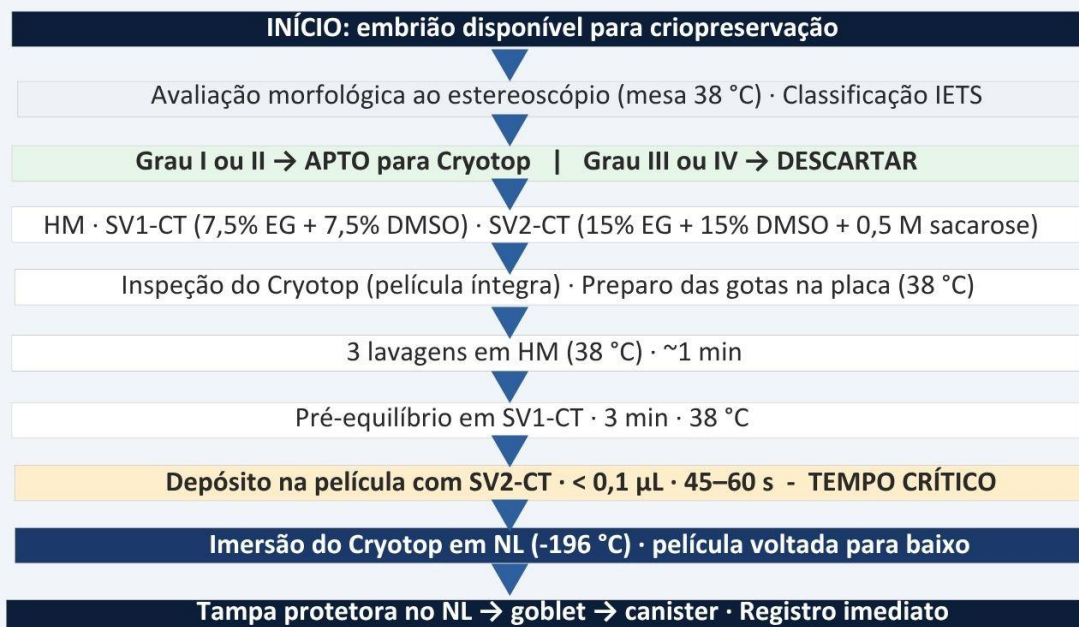
XIII. AÇÕES CORRETIVAS

Sobrevivência OPS < 70% 1. Revisar SV1/SV2-OPS. 2. Checar temperatura da mesa. 3. Revisar confecção das OPS. 4. Verificar tempo SV2 ≤ 20 s. 5. Retreinar.	Sobrevivência Cryotop < 80% 1. Revisar SV1/SV2-CT. 2. Volume na película < 0,1 µL. 3. Checar integridade. 4. Tempo SV2-CT 45–60 s. 5. Retreinar.
Sobrevivência DT < 65% 1. Concentração Sol. DT (1,4–1,5 M). 2. Tempo de exposição < 4 min. 3. Sistema de colunas correto. 4. Reaquecimento 20–25 °C/5–10 s. 5. Retreinar.	Embrião ausente / sem re-expansão 1. Inspeccionar dispositivo ao estereoscópio. 2. Temperatura SR1/SR2 (38 °C). 3. Registrar como perda. 4. Investigar falha no envase.
Falha em equipamento crítico 1. Interromper o procedimento. 2. Manter dispositivos em NL. 3. Acionar assistência técnica. 4. Registrar NC.	NL crítico < 30% 1. Suspender retirada de dispositivos. 2. Acionar fornecedor. 3. Verificar comprometimento. 4. Registrar.
Dispositivo com ID ilegível 1. Quarentenar — não utilizar. 2. Investigar rastreabilidade. 3. Registrar NC. 4. Reforçar protocolo de ID.	Reagente vencido utilizado 1. Interromper o procedimento. 2. Descartar lote. 3. Avaliar impacto. 4. Registrar e revisar controle.

XIV / XV – REGISTROS DE OCORRÊNCIAS E FREQUÊNCIA

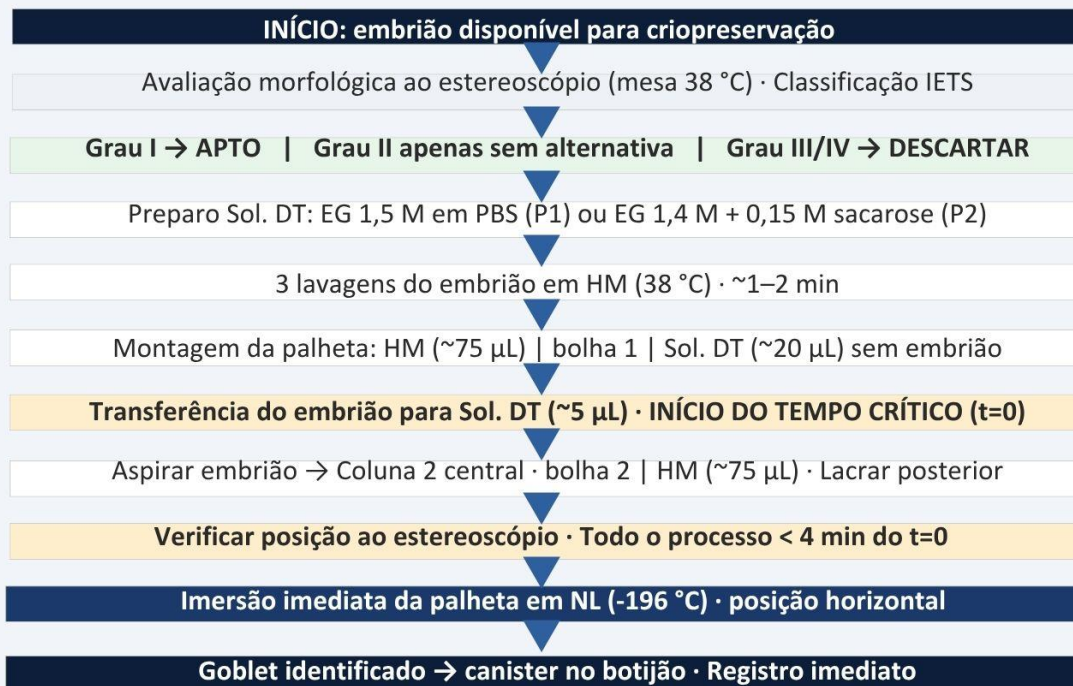
Documento	Campos Obrigatórios
Planilha de Criopreservação	Código, protocolo, data/hora, raça/ID, estágio, grau IETS, lote, técnico, assinatura.
Planilha de Estoque	Data, movimentação, código, protocolo, canister/goblet, saldo, responsável.
Planilha de Reaquecimento	Código, protocolo, re-expansão (S/N), ZP íntegra (S/N), aptidão, técnico, data.
Planilha de Temperatura	Data, hora, equipamento, temperatura medida, técnico. Antes de cada procedimento.
Planilha de Reagentes	Reagente, lote, vencimento, abertura, descarte, responsável.
Livro de Não Conformidades	Data/hora, NC, causa, ação corretiva, responsável, verificação, assinatura.
FREQUÊNCIA DOS PROCEDIMENTOS	
Controle de reagentes	Conforme demanda — após coleta in vivo ou sessão PIVE
Verificação de temperatura	Diariamente antes de procedimentos programados
Verificação do nível de NL	Quinzenalmente e antes de qualquer procedimento
Revisão deste POP	Anualmente ou quando houver mudança normativa
Treinamento dos executores	Antes da primeira execução; revisão anual

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

XVI.1 – FLUXOGRAMA: Criopreservação pelo Método OPS**XVI.2 – FLUXOGRAMA: Criopreservação pelo Método Cryotop**

CAPÍTULO 09- Procedimento operacional padrão

XVI.3 – FLUXOGRAMA: Criopreservação pelo Protocolo Direct Transfer



XVII. CONTROLE DE APROVAÇÕES PARA USO

Data da Aprovação	Nome do Responsável	Unidade/Subunidade
[Data 01]	[Responsável 01]	[Unidade/Subunidade 01]
[Data 02]	[Responsável 02]	[Unidade/Subunidade 02]
[Data 03]	[Responsável 03]	[Unidade/Subunidade 03]

Elaboração/Revisão por:

Aprovado por:

Data da Aprovação:

Código: CRYO-01 | Versão: 01 | Unidade: Laboratório de Reprodução Animal | Setor: Criopreservação Embrionária

10

Considerações finais

01

Para embriões in vivo de alta qualidade, vitrificação e DT são equivalentes (54–69% prenhez para Grau I), a escolha é logística, não biológica.

02

Para embriões PIVE, a vitrificação é biologicamente superior, elimina o chilling injury e os cristais intracelulares do congelamento lento.

03

O protocolo Embrapa VD (33% de prenhez, sem diferença estatística frente a embriões a fresco) representa o estado da arte para PIVE em campo.

04

A padronização dos procedimentos operacionais (POPs) é condição indispensável para a reprodutibilidade dos resultados, independente da técnica.

05

A Lei 15.021/2024 e a Portaria SDA/MAPA 1.204/2024 impõem responsabilidades claras ao médico veterinário RT sobre rastreabilidade e controle de qualidade.

"Vitrificação e Direct Transfer são técnicas complementares. Conhecer suas indicações e aplicá-las com base em protocolos padronizados é o que garante os resultados que a ciência já demonstrou serem possíveis."



Fonte: Imagem criada com o uso de IA

Referências bibliográficas

- BRASIL. Lei nº 15.021, de 12 de novembro de 2024. Dispõe sobre o controle de material genético animal. Brasília, DF: Presidência da República, 2024a. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/l15021.htm. Acesso em: 04 mai. 2026.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Portaria SDA/MAPA nº 1.204, de 28 de novembro de 2024. Estabelece os procedimentos para registro, controle e fiscalização de estabelecimentos de coleta e processamento de embriões de animais domésticos. Brasília, DF: MAPA, 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/material-genetico/ccpe>. Acesso em: 04 mai. 2026.
- DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 149-159, jul./set. 2010.
- DOCHI, O. et al. Direct transfer to recipients of embryos cryopreserved using ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 43, n. 7, p. 1261-1267, 1995.
- IETS – INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: 2022 Data Retrieval Report. Champaign: IETS, 2022. Disponível em: <https://www.iets.org>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- IETS – INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: 2023 Data Retrieval Report. Champaign: IETS, 2023. Disponível em: <https://www.iets.org>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- KUWAYAMA, M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 11, n. 5, p. 608-614, 2005.
- LEIBO, S. P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v. 21, n. 5, p. 767-790, 1984.
- MAPLETOFT, R. J. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 10, n. 3, p. 168-173, jul./set. 2013.
- MARIN, C. et al. Experimental evidence reveals both cross-infection and cross-contamination risk of embryo storage in liquid nitrogen biobanks. *Animals*, v. 10, n. 4, p. 598, 2020. DOI: 10.3390/ani10040598.
- OLIVEIRA, C. S. et al. Processo Embrapa Vitrificação Direta (VD) para vitrificação e transferência direta de embriões bovinos. Brasília: Embrapa, 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 32, n. 2, p. 365-395, 2016.

- STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. (Ed.). Manual of the International Embryo Transfer Society. 4. ed. Savoy: IETS, 2007.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). Manual of the International Embryo Transfer Society. 3. ed. Savoy: IETS, 1998.
- VAJTA, G. et al. 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.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.
- VOELKEL, S. A.; HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v. 37, n. 1, p. 23-37, 1992.
- WILMUT, I.; ROWSON, L. E. A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*, v. 92, p. 686-690, 1973.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação de embriões bovinos constitui, na contemporaneidade, um dos elos mais estratégicos da cadeia produtiva da biotecnologia reprodutiva bovina, permitindo o armazenamento, a distribuição e a preservação de material genético de alto valor em escala nacional e internacional. O Brasil, como maior transferidor mundial de embriões bovinos, encontra-se em posição privilegiada para se beneficiar dos avanços científicos e tecnológicos nessa área, com reflexos diretos sobre a competitividade e a sustentabilidade da pecuária nacional. A presente revisão de literatura permitiu sistematizar o conhecimento disponível sobre as duas principais técnicas de criopreservação aplicadas à rotina da TE bovina, a vitrificação e o *Direct Transfer*, evidenciando suas bases científicas, protocolos, dispositivos, resultados reprodutivos e boas práticas associadas.

Com base na literatura analisada, pode-se concluir que a vitrificação representa o método de criopreservação de maior eficiência biológica para embriões bovinos, especialmente os produzidos *in vitro*, pela eliminação completa dos cristais de gelo durante o processo criogênico. A introdução da Open Pulled Straw (OPS) por Vajta *et al.* (1998) foi um marco decisivo na evolução da técnica, tornando viável a vitrificação em escala comercial. O desenvolvimento subsequente do Cryotop por Kuwayama *et al.* (2005) e do protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD) pela Embrapa (2023) ampliou as possibilidades de aplicação da vitrificação, incluindo sua associação com a transferência direta para uso em campo. Os resultados reprodutivos com embriões PIVE vitrificados pelo protocolo Embrapa Vitrificação Direta (VD) (33% de prenhez vs 44% para embriões a fresco, sem diferença estatística) representam um avanço expressivo e abrem perspectivas para a popularização da vitrificação em programas de campo no Brasil.

O *Direct Transfer*, por sua vez, é consolidado e amplamente utilizado para embriões *in vivo*, apresentando taxas de prenhez equivalentes às da vitrificação para esse tipo de embrião (em torno de 54% a 69% para embriões Grau I). Sua principal vantagem é a simplicidade operacional em campo, eliminando as etapas de remoção do crioprotetor em bancada laboratorial. Para embriões PIVE, os resultados com DT convencional são inferiores aos da vitrificação, limitando sua aplicação a programas com infraestrutura laboratorial reduzida ou onde o custo operacional é fator determinante.

A análise das boas práticas demonstrou que a padronização dos procedimentos operacionais é fator determinante para a reprodutibilidade e a consistência dos resultados de

criopreservação. Erros técnicos em etapas críticas, como o tempo de exposição às soluções vitrificantes, a indução do seeding no DT, a manutenção do nitrogênio líquido e a rastreabilidade das palhetas, são causas frequentes de variabilidade nos resultados reprodutivos. A implementação de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), o treinamento contínuo das equipes técnicas e o uso de sistemas de controle de qualidade e rastreabilidade são, portanto, medidas indispensáveis para a excelência nos programas de criopreservação embrionária bovina.

Do ponto de vista das perspectivas futuras, a tendência de crescimento da PIVE bovina no Brasil e no mundo, combinada com o aumento da demanda por embriões criopreservados de alta qualidade genética, deve impulsionar o desenvolvimento de novos protocolos de vitrificação com transferência direta, bem como de novos crioprotetores menos tóxicos e de novos dispositivos que combinem alta velocidade de resfriamento com segurança sanitária. O uso de citocinas como FGF2, LIF e IGF1 no cultivo embrionário pré-criopreservação (Stoecklein *et al.*, 2021) e a aplicação de ferramentas de inteligência artificial para seleção de embriões antes da criopreservação são áreas de pesquisa em desenvolvimento que prometem elevar ainda mais as taxas de sobrevivência e prenhez pós-criopreservação nas próximas décadas.

Conclui-se que a vitrificação e o *Direct Transfer* são técnicas complementares e igualmente indispensáveis no arsenal biotecnológico da reprodução bovina brasileira. A escolha entre elas deve ser embasada em análise criteriosa do tipo de embrião disponível, das condições de campo e laboratório, dos objetivos do programa e dos recursos disponíveis. A adoção de boas práticas padronizadas é a condição fundamental para que qualquer técnica de criopreservação produza os resultados reprodutivos que a ciência demonstrou serem alcançáveis. O manual técnico derivado desta revisão de literatura visa contribuir para essa padronização, disponibilizando de forma organizada e acessível as informações científicas necessárias para a execução segura e eficiente da criopreservação de embriões bovinos por vitrificação e *Direct Transfer*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTA GENETICS. Embriões bovinos *Direct Transfer*. Alta Genetics Brasil, 2024. Disponível em: <https://altagenetics.com.br/embrioies>. Acesso em: 20 abr. 2026.

ASBIA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório anual 2021. São Paulo: ASBIA, 2021.

BATISTELA, M. V. V. *et al.* Produção *in vitro* de embriões e novas estratégias na produção animal. Centro Científico Conhecer, Jandaia-GO, v. 20, n. 46, 2023. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

BÓ, G. A. Embryo transfer in cattle: management and selection of donors and recipients. *Animal Reproduction Science*, [s. l.], v. 82-83, p. 87-99, 2004.

BOS-MIKICH, A. *et al.* Tópicos em embriologia clínica: criopreservação. Porto Alegre: UFRGS, 2007. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/topicosembriao/Criopreserv.html>. Acesso em: 20 abr. 2026.

BRACKETT, B. G. *et al.* Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

BRASIL. Lei nº 15.021, de 12 de novembro de 2024. Dispõe sobre o controle de material genético animal e sobre a obtenção e o fornecimento de clones de animais domésticos destinados à produção de animais domésticos de interesse zootécnico e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, 2024a. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/115021.htm. Acesso em: 04 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Portaria SDA/MAPA nº 1.204, de 28 de novembro de 2024. Estabelece os procedimentos para registro, controle e fiscalização de estabelecimentos de coleta e processamento de embriões de animais domésticos. Brasília, DF: MAPA, 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/material-genetico/ccpe>. Acesso em: 04 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 25 de julho de 2018. Incorpora ao ordenamento jurídico nacional os requisitos zoossanitários dos Estados Partes do MERCOSUL para a importação de embriões de bovinos e bubalinos coletados *in vivo* e/ou produzidos *in vitro*. Brasília, DF: MAPA, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34932267. Acesso em: 04 mai. 2026.

CENATTE EMBRIÕES. Método de congelamento lento (One Step) de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma solução para o campo. Cenatte, 2015. Disponível em: <https://www.cenatte.com.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

CHAVES, D. F.; ALVES, M. J. Protocolo de receptoras de embriões: índices de aproveitamento de corpo lúteo e taxa de prenhez. *Animal Reproduction*, [s. l.], v. 9, p. 7, 2023.

DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 149-159, jul./set. 2010. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

DOCHI, O. *et al.* Direct Transfer to recipients of embryos cryopreserved using ethylene glycol. *Theriogenology*, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1261-1267, 1995.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Biotecnologia aplicada à pecuária bovina. Brasília: Embrapa, 2004. (Embrapa Gado de Corte. Documentos).

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of Food and Agriculture 2021: making agrifood systems more resilient to shocks and stresses. Rome: FAO, 2021.

HAJARIAN, H. *et al.* Cryotop and development of vitrified immature bovine oocytes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/nT9TJ3zQbgz5dmhpYNrsNLJ>. Acesso em: 20 abr. 2026.

IETS – INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: 2022 Data Retrieval Report. Champaign: IETS, 2022. Disponível em: <https://www.iets.org>. Acesso em: 20 abr. 2026.

IETS – INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: 2023 Data Retrieval Report. Champaign: IETS, 2023. Disponível em: <https://www.iets.org>. Acesso em: 20 abr. 2026.

JOAQUIM, D. C. *et al.* Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination. *Human Reproduction Update*, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 518-533, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/Joaquim5584362>. Acesso em: 20 abr. 2026.

JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS. Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep and goats. *JoVE*, [s. l.], n. 54, 2011. DOI: 10.3791/2764. Disponível em: <https://www.jove.com>. Acesso em: 20 abr. 2026.

KUWAYAMA, M. *et al.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online*, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 608-614, 2005.

LEIBO, S. P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 767-790, 1984.

MAPLETOFT, R. J. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 10, n. 3, p. 168-173, jul./set. 2013.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamentos técnicos para produção, coleta, processamento e transferência de embriões de bovinos. Brasília: MAPA, 2023.

MARIN, C. *et al.* Experimental evidence reveals both cross-infection and cross-contamination risk of embryo storage in liquid nitrogen biobanks. *Animals*, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 598, 2020. DOI: 10.3390/ani10040598.

MARTINEZ-RODRIGUEZ, I. *et al.* A shorter equilibration period improves post-warming outcomes after vitrification and in straw dilution of *in vitro*-produced bovine embryos. *Animals*, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 596, 2021. DOI: 10.3390/ani11030596.

MELLO, R. R. C. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

MENDONÇA, L. Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE): como funciona? Rehagro, 2023. Disponível em: <https://rehagro.com.br/blog/producao-in-vitro-de-embrioes>. Acesso em: 20 abr. 2026.

OLIVEIRA, A. Coleta não cirúrgica de embriões bovinos. CPT, 2013. Disponível em: <https://www.cpt.com.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Processo Embrapa Vitrificação Direta (VD) para vitrificação e transferência direta de embriões bovinos. Brasília: Embrapa, 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

ONGARATTO, F. L. Criopreservação de embriões bovinos. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/22916>. Acesso em: 20 abr. 2026.

PAIXÃO, G. M. Q. Técnicas auxiliares de reprodução em bovinos: relatório de estágio acessório. 2015. Relatório (Estágio Curricular) – Universidade de Évora, Évora, 2015. Disponível em: <http://dspace.uevora.pt>. Acesso em: 20 abr. 2026.

PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 365-395, 2016.

PINTO, C. R. Embryo transfer in cattle: management and nutrition. *MSD Veterinary Manual*, 2022. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com>. Acesso em: 20 abr. 2026.

PUGLIESI, G. *et al.* Evolution over the last 40 years of the assisted reproductive technologies in cattle: the Brazilian perspective for embryo transfer and resynchronization programs (part II). *Animal Reproduction*, [s. l.], v. 21, n. 3, 2024. DOI: 10.1590/1984-3143-AR2024-0058.

PYLES, E. S. C. S. Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. 2006. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.

- RAMOS, A. A. *et al.* Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, [s. l.], 2025. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/txySHTTCBRqYWPvyNJRZgGr>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- REYES, J. N. V. *et al.* Cryopreservation method and composition of the vitrification solution affect viability of *in vitro* bovine embryos. *Redalyc*, 2021. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/2950/295045610007>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, M. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 43, n. 2, p. 204-208, abr./jun. 2019. Disponível em: <http://cba.org.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- RODRIGUES, M. Governo amplia acesso ao crédito para melhoramento genético da pecuária sustentável. *Boiapasto*, 2026. Disponível em: <https://boiapasto.com.br>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. *Revista Brasileira de Zootecnia*, [s. l.], v. 36, supl., 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/5w8nJZycRWFwKhptLbTvnCp>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- RUMPF, R. *et al.* Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 25-32, 2000.
- SANTIN, T. R. *et al.* Criopreservação de embriões: metodologias de vitrificação. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 561-574, set. 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277228713>. Acesso em: 20 abr. 2026.
- STOECKLEIN, K. S. *et al.* Improved cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos using FGF2, LIF, and IGF1. *PLOS ONE*, [s. l.], v. 16, n. 2, e0243727, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0243727.
- STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. (Ed.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 4. ed. Savoy: IETS, 2007.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*. 3. ed. Savoy: IETS, 1998.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Livestock and poultry: world markets and trade*. Washington: USDA, 2022.
- VAJTA, G. *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.
- VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. (Comunicado Técnico, n. 59).

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, [s. l.], v. 178, p. 411-414, 1972.

WILMUT, I.; ROWSON, L. E. A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*, [s. l.], v. 92, p. 686-690, 1973.

ANEXO 1

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO DE PRODUÇÃO
ACADÊMICA

O(A) estudante Carlos José de Souza
do curso de Medicina Veterinária, matrícula 2022-2013000143,
telefone: 91991568352, e-mail carlosjose100@gmail.com,
na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei no 9.610/98 (Lei
dos Direitos do autor), autoriza a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás)
a disponibilizar o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado
Criopreservação de embriões bovinos: Boas práticas
nas técnicas de vitrificação e direct transfer

gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, por 5 (cinco) anos, conforme
permissões do documento, em meio eletrônico, na rede mundial de computadores, no
formato especificado (Texto (PDF); Imagem (GIF ou JPEG); Som (WAVE, MPEG,
AIFF, SNS); Video (MPEG, MWV, AVI, QT); outros, específicos da área; para fins de
leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada
nos cursos de graduação da PUC Goiás.

Goiânia, 03 de Junho de 2026.

Assinatura do(s): autor(es): Carlos José de Souza

Nome completo do autor: Carlos José de Souza

Assinatura do professor- orientador: 

Nome completo do professor-orientador: Gustavo Lage Costa