



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES  
BOVINOS COM ETILENOGLICOL ASSOCIADO OU NÃO A  
TREALOSE**

---

**Luiz Fernando Cáceres Pilla**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES  
BOVINOS COM ETILENOGLICOL ASSOCIADO OU NÃO A  
TREALOSE**

---

**Por**

**Luiz Fernando Cáceres Pilla**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, Abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES  
BOVINOS COM ETILENOGLICOL ASSOCIADO OU  
NÃO A TREALOSE**

elaborada por  
**Luiz Fernando Cáceres Pilla**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Mara Iolanda Batistella Rubin**  
(Presidente/ Orientadora)

---

**Alceu Mezzalira**

---

**Maria Gabriela Tavares Rheingantz**

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2005.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais pelo total apoio que recebi na execução desse trabalho. Pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis. Vocês que se dedicaram junto comigo, muito obrigado!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Rubin, minha orientadora, pelos ensinamentos e pelo imensurável auxílio na elaboração e execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Antonio Mondino Silva, pela orientação e execução desse trabalho, bem como pela gentileza ao ceder as doadoras para o presente experimento.

Aos veterinários Cyro da Porciúncula Dias da Costa e Fabrício Desconsi Mozzaquatro, que tiveram participação decisiva nesse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mari Lourdes Bernardi, pelo constante apoio e sugestões na elaboração da dissertação.

Aos colegas do Embryolab, estagiários e pós-graduandos, em especial ao Juliano Calegari e Márcia V. dos Santos, que fizeram mais do que o trivial. Sem vocês eu não teria alcançado esse objetivo. Muito Obrigado!

Aos funcionários da Fazenda Invernada Grande, em especial ao Sr. Roni Bitencourt, que ultrapassaram suas obrigações diárias para que todo o trabalho transcorresse adequadamente. Muito Obrigado!

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À OURO FINO SAÚDE ANIMAL pela cedência de parte das prostaglandinas utilizadas no experimento.

## SUMÁRIO

<b>FOLHA DE ROSTO.....</b>	<b>ii</b>
<b>FOLHA DE APROVAÇÃO.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. CAPÍTULO 1. Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol associado ou não a trealose .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Resumo.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Material e Método.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Resultados e discussão.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Referências.....</b>	<b>16</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>21</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>22</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Índice de prenhez por ultra-sonografia, aos 28 dias, de embriões bovinos produzidos *in vivo* e congelados pelo método ultra-rápido..... 13
- Tabela 2. Prenhez de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vivo* e congelados pelo método ultra-rápido..... 14

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES BOVINOS COM ETILENOGLICOL ASSOCIADO OU NÃO A TREALOSE.**

AUTOR: Luiz Fernando Cáceres Pilla  
Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin  
Santa Maria, 24 de fevereiro de 2005.

A criopreservação tem fundamental importância na armazenagem, transporte, controle sanitário e comércio de embriões. O método de congelamento rápido convencional de embriões bovinos ainda apresenta entraves como o tempo de execução e o alto valor comercial do equipamento. Com a finalidade de minimizar tempo de congelamento e os custos, avaliou-se o efeito da trealose no congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol. Noventa e sete (n=97) embriões bovinos produzidos *in vivo* foram congelados pelo método ultra-rápido com 3,0M de etilenoglicol e 3,0M de etilenoglicol + 0,3M de trealose. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos. No tratamento 1 (T1) quarenta e seis (n= 46) embriões foram expostos à solução de 3,0M de etilenoglicol em solução de manutenção Emcare®(ICP) e cinquenta e um (n= 51) embriões foram congelados com 3,0M de etilenoglicol associado a 0,3M de trealose em solução de manutenção Emcare®. Os embriões foram mantidos na solução de congelamento por 2 minutos, envasados em palhetas de 025cc, expostos ao vapor de nitrogênio por 20 segundos e submersos no nitrogênio líquido. Após o descongelamento, os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas, resultando aos 28 dias, em 7 (15,21%) gestações no T1 e 7 (13,72%) no T2. Não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos. O acréscimo de trealose ao etilenoglicol mostrou-se viável para a transferência direta dos embriões, porém o índice de concepção obtido ainda não permite sua indicação no congelamento comercial de embriões bovinos.

Palavras-chave: Congelamento, ultra-rápido, embriões bovinos, transferência direta.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation in Veterinary Medicine  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

### **ULTRA-RAPID FREEZING OF BOVINE EMBRYOS WITH ETHYLENE GLYCOL WITH OR WITHOUT TREHALOSE.**

Author: Luiz Fernando Cáceres Pilla  
Adviser: Mara Iolanda Batistella Rubin  
Santa Maria February 24, 2005.

Cryopreservation is currently the universal method for embryo storage, transport, sanitary control and trading. The conventional bovine embryo freezing method still has some drawbacks such as the freezing period and costs of the freezing equipment. In order to decrease costs and time, the effect of thealose on ultra-rapid freezing with ethylene glycol was evaluated. Ninety seven *in vivo* produced bovine embryos were randomly distributed in two treatments for ultra-rápid deep freezing with 3.M ethylene glycol (T1; n= 46) and 3.M ethylene glycol + 0.3M trehalose (T2; n= 51). In T1, embryos were exposed to a 3.0M ethylene glycol in Emcare® (ICP) holding media and in T2 to a 3.0M ethylene glycol plus 0.3M trehalose in Emcare® holding media. Embryos of both treatments were kept for 2 minutes in the freezing solutions; loaded in 0,25cc straws and there after they were exposed to N<sub>2</sub> vapor during 20 seconds to be plunged immediately into liquid nitrogen. After thawing, embryos were transferred to previously synchronized recipients resulting at 28 days in 7 (15.21%) pregnancies in T1 and also 7 (13.72%) in T2. No significant difference was detected between treatments (P>0.05). The trehalose and ethylene glycol solution is suitable for direct transfer of bovine embryos. However, the conception rate obtained in this study do not allow its indication for commercial embryo freezing.

Key Words: freezing, ultra-rapid, bovine embryos, direct transfer.



## 1. INTRODUÇÃO

Nos programas de transferência de embriões (TE), a criopreservação tem fundamental importância na armazenagem, transporte, controle sanitário e comércio de embriões.

A experiência alcançada em pesquisas com o congelamento ultrarrápido de embriões de ratos (CHUPIN & DE REVIERS, 1986) e camundongos (RAYOS *et al.*, 1992; BERNARDI *et al.*, 1990/1992, MEZZALIRA & RUBIN, 1992), permitiu que protocolos similares de criopreservação fossem aplicados para embriões bovinos produzidos *in vivo*.

No procedimento rápido (convencional) de congelamento, a velocidade do abaixamento da temperatura é um fator importante (LEIBO *et al.*, 1978; LEIBO & MAZUR, 1978; LEIBO, 1989). Este método de congelamento apresenta entraves como o tempo de execução do procedimento e o alto valor comercial do equipamento de congelamento. Nos casos do uso do glicerol 1,5M, necessita-se controle pós-descongelamento sob estereomicroscópico em placas de Petri, além do tempo para a rehidratação dos embriões.

O método de congelamento convencional em bovinos teve um importante avanço com o uso do etilenoglicol (EG) na concentração de 1,8M (SUZUKI *et al.*, 1993) para embriões produzidos *in vitro*; 1,5M (VOELKEL & HU, 1992) e 1,8M (DOCHI, 1995); ou 1,5M e 1,8M (McINTOCH & HAZELEGER, 1994) para embriões produzidos *in vivo*. O EG possui alta permeabilidade e baixa toxicidade permitindo a transferência direta, sem a necessidade do descongelamento em etapas,

simplificando a metodologia nos programas comerciais de transferência de embriões.

A trealose é um dissacarídeo formado por 1,1 ligação de duas moléculas de D-glucose (BIRCH, 1963), encontrada numa variedade de organismos biológicos (BIRCH, 1963; ELBEIN, 1974) e que preserva a estrutura e funcionalidade das membranas durante desidratação (RUDOLPH & CROWE, 1985).

A literatura mundial referente ao congelamento pelo método ultra-rápido de embriões bovinos produzidos *in vivo* é extremamente escassa (CHUPIN, 1986/1987; BERNARDI *et al.*, 1991; MEZZALIRA *et al.*, 1996; ALMEIDA, 2001)., principalmente pelo custo elevado dos programas de superovulação e sincronização das receptoras. Já ALMEIDA (2001) obteve 40% de prenhez com embriões produzidos *in vivo* congelados com 3,0M de etilenoglicol associado a 0,3M de trealose, porém com reduzido número de embriões transferidos (2/5). A eficiência do método permanece na dependência da continuidade do estudo e incremento no número de embriões transferidos.

Assim, avaliou-se o efeito da solução de 3,0M de etilenoglicol associado ou não a 0,3M de trealose, em meio de manutenção ECHM-100 Emcare®, no congelamento ultra-rápido de embriões bovinos produzidos *in vivo* sobre a taxa de concepção.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na criopreservação de embriões, busca-se manter em inércia o metabolismo, tornando viável a conservação celular em temperaturas extremamente baixas por um período de tempo indeterminado (RALL, 1992). No processo de congelamento, os embriões devem ser transferidos de uma solução isotônica para uma solução hipertônica, crioprotetora. Em consequência do gradiente de pressão osmótica, ocorre a saída de água do interior celular para que ocorra o equilíbrio osmótico. A redução do tamanho das células ocorre quando o equilíbrio é refeito, entre a saída de água e a entrada do crioprotetor (GORDON, 1994).

A água é o principal constituinte celular e uma adequada desidratação é importante para que não ocorra formação de grandes cristais de gelo, bem como para prevenir a excessiva concentração de solutos intracelulares (MAZUR *et al.*, 1972). Já o choque osmótico pode ocorrer se o crioprotetor intracelular que entrou na célula embrionária não pode difundir-se para o meio extracelular rapidamente, como consequência, ocorre o edemaciamento excessivo após a exposição ao meio isotônico ou ao útero da receptora (DOCHI *et al.*, 1995).

O congelamento utilizado para embriões bovinos é um processo lento controlado (VAN WAGTENDONK DE LEEUW *et al.*, 1995). Nesse sistema, a velocidade de congelamento é inferior a 1°C/minuto e permite a desidratação progressiva das células (WHITTINGHAM, 1972; WILMUT & ROWSON, 1973; LEHN-JENSEN, 1980). Com a indução da cristalização entre -5 a -7°C, o processo de desidratação é iniciado, procedimento este que evita o super-resfriamento (LEIBO *et al.*, 1978; LEIBO & MAZUR, 1978; LEIBO, 1989) e, conseqüentemente, a formação de gelo intracelular (SCHNEIDER, 1986).

No processo de congelamento ultra-rápido não há a necessidade de um abaixamento lento da temperatura, pois a desidratação ocorre

osmoticamente durante o tempo de equilíbrio (RENARD *et al.*, 1984; LANGIS & STEPONKUS, 1990), devido a maior concentração dos crioprotetores, que são responsáveis pela menor formação de cristais de gelo intracelular (TAKEDA *et al.*, 1984; RALL, 1987).

As soluções crioprotetoras são solutos orgânicos que protegem as organelas celulares durante o congelamento (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Segundo WOLFE & BRYANT (1999), os solutos podem ser classificados em três grandes categorias: (1) sais, (2) açúcares e outras moléculas de médio tamanho e em (3) macromoléculas. A sobrevivência dos embriões depende do tipo de crioprotetor, da espécie e da idade de desenvolvimento, bem como do tipo de embrião produzido (*in vivo* ou *in vitro*). A toxicidade dos crioprotetores é proporcional ao aumento da concentração e ao tempo de exposição dos embriões aos mesmos, este fato é mais evidente em função da alta concentração requerida nos protocolos para vitrificação (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Os crioprotetores são também diferenciados pela sua atividade intra- e extracelular. Aqueles com ação intracelular são representados principalmente pelo glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol. Como substâncias não permeáveis à célula pode-se citar as proteínas (albumina sérica bovina), os açúcares (sacarose, lactose e trealose, entre outros) e o ácido hialurônico (glicosaminoglicano).

Os açúcares são freqüentemente utilizados na criopreservação, tornando-se um importante componente do tampão osmótico. Usualmente, os dissacarídeos são usados para o congelamento e descongelamento de embriões e oócitos (KULESHOVA *et al.*, 1999). Segundo SCHNEIDER & MAZUR (1984) a sacarose atua como uma contraforça osmótica para restringir o movimento de água através das membranas. Se a sacarose está presente numa concentração isomolar, o embrião não irá intumescer, mas irá retrair progressivamente como um crioprotetor que deixa a célula.

A trealose foi utilizada em soluções crioprotetoras (Krag *et al.*, 1985; Schellander *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1996) por manter uma alta pressão osmótica no meio extracelular durante a entrada e a remoção do crioprotetor, desse modo são prevenidos o choque osmótico e a lise celular. A desidratação é uma característica comum durante o processo de congelamento de embriões ou sistemas biológicos e a água é fundamental para manter a estabilidade da estrutura molecular, assim como a formação das proteínas e lipídeos das membranas biológicas ou de lipossomos (Tanford, 1980; Hvidt & Westh, 1992). Segundo Nicolajsen & Hvidt (1994), a trealose em baixas concentrações diminui a extensão dos danos aos lipossomos a temperaturas abaixo de -15°C.

Duas pesquisas realizadas nesta década demonstraram que uma pequena quantidade de trealose pode incrementar significativamente a viabilidade de células de mamíferos, congeladas ou dissecadas (Eroglu *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000). Sua presença restringe o movimento de água através das membranas, prevenindo a lise dos blastômeros na difusão do crioprotetor para o espaço extracelular (Massip *et al.*, 1987).

Os protocolos de congelamento ultra-rápido descritos até o momento empregam soluções altamente concentradas de crioprotetores e açúcares que induzem a desidratação rápida das células. Este fato permite a imersão direta no vapor de nitrogênio ou no nitrogênio líquido (Schneider & Mazur, 1984; Vajta *et al.*, 1998).

O etilenoglicol por possuir baixo peso molecular, é um crioprotetor efetivo para embriões bovinos, pela sua menor toxicidade associada a uma rápida permeabilidade (Fahy *et al.*, 1987), quando comparado com o glicerol e propilenoglicol (Voelkel & Hu, 1992). Na década passada, o etilenoglicol, que possui rápida difusão através da membrana celular (Sommerfeld & Niemann, 1999; Kuleshova *et al.*, 1999), passou a ser utilizado comercialmente por permitir a transferência direta de embriões bovinos.

O êxito obtido com congelamento ultra-rápido de embriões tem sido inconstante e ainda carece de estudos. MEZZALIRA *et al.* (1996) obtiveram 19,2% (5/26) de prenhez com a transferência de embriões bovinos produzidos *in vivo* congelados pelo método ultra-rápido com 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose em meio DPBSm (Dulbeccos phosphate-buffered saline modified) Posteriormente, ALMEIDA (2001) alcançou 14% (1/7); 40% (2/5) e 43% (3/7) de gestações congelando embriões bovinos também pelo método ultra-rápido com 2,0M de EG e 0,3M trealose; 3,0M de EG e 0,3M trealose e pelo método rápido (convencional) com 1,5M de etilenoglicol em DPBSm, respectivamente.

MOZZAQUATRO (2004) expôs embriões bovinos produzidos *in vitro* ao etilenoglicol 3,0M, acrescido ou não de diferentes concentrações (0,1, 0,3 e 0,5M) de trealose reidratando-os imediatamente. No estudo nenhum efeito tóxico foi observado.

A uso do etilenoglicol (EG) possibilitou a transferência direta de embriões bovinos obtendo índices de gestações entre 50 a 60%. O uso deste método para oócitos associado ou não a carboidratos (SAHA & SUZUKI, 1997; BAUTISTA & KANAGAWA, 1998; KULESHOVA *et al.*, 1999), tem despertado um interesse crescente para o comércio nacional e internacional. Os equipamentos de congelamento à disposição no mercado oferecem a praticidade necessária para a rotina comercial de embriões bovinos, porém os mesmos ainda continuam tendo um custo extremamente elevado.

### 3- Capítulo 1

## CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES BOVINOS COM ETILENOGLICOL ASSOCIADO OU NÃO A TREALOSE

(Ultra-rapid freezing of bovine embryos with ethylene glycol with or without trehalose)

PILLA, L.F.C.<sup>1,2</sup>, MOZZAQUATRO, F.D.<sup>2</sup>, CALEGARI, J.<sup>3</sup>, SANTOS, M.V.<sup>3</sup>, BERNARDI, M. L.<sup>4</sup>, SILVA, C.A.M.<sup>5</sup>, RUBIN, M.I.B.<sup>5,1</sup>.

<sup>1</sup> MV, Rua Visconde de Pelotas, 1623/301. 97015-140 Santa Maria RS.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM/RS.

<sup>3</sup> Bolsista de Iniciação Científica, UFSM/RS

<sup>4</sup> Deptº de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre RS. Brasil

<sup>5</sup> DVM, Embryolab – Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais Universidade Federal de Santa Maria 97.105-900 – Santa Maria RS. Brasil.

### AGRADECIMENTOS

À OURO FINO SAÚDE ANIMAL pelo fornecimento de prostaglandinas, ao Prof. Carlos Augusto Mallmann do LAMIC/UFSM, pelo constante apoio, ao Centro de Tecnologia Cruz de Pedra de Uruguaiana/RS pela cedência das doadoras utilizadas nesse trabalho e ao CNPq pela bolsa de estudos.

---

<sup>1</sup> Autor para correspondência E-mail: [mararubin@smail.ufsm.br](mailto:mararubin@smail.ufsm.br) ou [embryolab@www.ufsm.br](mailto:embryolab@www.ufsm.br)

## CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES BOVINOS COM ETILENOGLICOL ASSOCIADO OU NÃO A TREALOSE

(Ultra-rapid freezing of bovine embryos with ethylene glycol with or without trehalose)

### RESUMO

A criopreservação tem fundamental importância na armazenagem, transporte, controle sanitário e comércio de embriões. O método de congelamento rápido convencional de embriões bovinos ainda apresenta entraves como o tempo de execução e o alto valor comercial do equipamento. Com a finalidade de minimizar tempo de congelamento e os custos, avaliou-se o efeito da trealose no congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol. Noventa e sete (n=97) embriões bovinos produzidos *in vivo* foram congelados pelo método ultra-rápido com 3,0M de etilenoglicol e 3,0M de etilenoglicol + 0,3M de trealose. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos. No tratamento 1 (T1) quarenta e seis (n= 46) embriões foram expostos à solução de 3,0M de etilenoglicol em solução de manutenção Emcare®(ICP) e cinquenta e um (n= 51) embriões foram congelados com 3,0M de etilenoglicol associado a 0,3M de trealose em solução de manutenção Emcare®. Os embriões foram mantidos na solução de congelamento por 2 minutos, envasados em palhetas de 025cc, expostos ao vapor de nitrogênio por 20 segundos e submersos no nitrogênio líquido. Após o descongelamento, os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas, resultando aos 28 dias, em 7 gestações no T1 (15,21%) e 7 (13,72%) no T2. Não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos. O acréscimo de trealose ao etilenoglicol mostrou-se viável para a transferência direta dos embriões, porém o índice de concepção obtido ainda não permite sua indicação no congelamento comercial de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Congelamento, ultra-rápido, embriões, bovinos, transferência direta.

### ABSTRACT

Cryopreservation is currently the universal method for embryo storage, transport, sanitary control and trading. The conventional bovine embryo freezing method still drawbacks such as the freezing period and costs of the freezing equipment. In order to decrease costs and time, the effect of trehalose on ultra-rapid freezing with ethylene glycol was evaluated. Ninety seven *in vivo* produced bovine embryos were randomly distributed



in two treatments for ultra-rapid deep freezing with 3.M ethylene glycol (T1; n= 46) and 3.M ethylene glycol + 0.3M trehalose (T2; n= 51). In T1, embryos were exposed to a 3.0M ethylene glycol in Emcare® (ICP) holding media and in T2 to a 3.0M ethylene glycol plus 0.3M trehalose in Emcare® holding media. Embryos of both treatments were kept for 2 minutes in the freezing solutions; loaded in 0,25cc straws and there after they were exposed to N<sub>2</sub> vapor during 20 seconds to be plunged immediately into liquid nitrogen. After thawing, embryos were transferred to previously synchronized recipients resulting at 28 days in 7 (15.21%) pregnancies in T1 and also 7 (13.72%) in T2. No significant difference was detected between treatments (P>0.05). The trehalose and ethylene glycol solution is suitable for direct transfer of bovine embryos. However, the conception rate obtained in this study do not allow its indication for commercial embryo freezing.

**Key Words:** freezing, ultra-rapid, bovine embryos, direct transfer.

## Introdução

O método de congelamento convencional em bovinos teve um importante avanço com o uso do etilenoglicol para embriões produzidos *in vitro* (SUZUKI *et al.*, 1993) ou produzidos *in vivo* (VOELKEL & HU, 1992; DOCHI, 1995; McINTOSH & HAZELEGER, 1994). A alta permeabilidade e baixa toxicidade do etilenoglicol permitiu a transferência direta simplificando a metodologia nos programas comerciais de transferência de embriões.

Os crioprotetores possuem atividade intra- (glicerol, dimetilsulfóxido e etilenoglicol) e extracelular (albumina sérica bovina, sacarose, lactose, trealose e ácido hialurônico). A trealose é comumente utilizada nas soluções de congelamento (SAHA *et al.*, 1996), pois mantém uma alta pressão osmótica no meio extracelular durante a entrada e a remoção do crioprotetor (YOON *et al.*, 1998).

O método ultra-rápido foi desenvolvido e testado com notável eficiência em ratos (CHUPIN & DE REVIERS, 1986), e camundongos

(RAYOS *et al.*, 1992; BERNARDI *et al.*, 1990/1992, MEZZALIRA & RUBIN, 1992), justificando o uso do método no congelamento de embriões bovinos (CHUPIN, 1986/1987; BERNARDI *et al.*, 1991; MEZZALIRA *et al.*, 1996; ALMEIDA, 2001).

No processo de congelamento ultra-rápido não há a necessidade de um abaixamento lento da temperatura, pois a desidratação ocorre osmoticamente durante o tempo de equilíbrio (RENARD *et al.*, 1984; LANGIS & STEPONKUS, 1990), devido a maior concentração dos crioprotetores, que são responsáveis pela menor formação de cristais de gelo intracelular (TAKEDA *et al.* 1984; RALL, 1987).

BERNARDI *et al.* (1991), utilizando glicerol e sacarose com protocolo similar a suas pesquisas *in vitro* com embriões de camundongas, desenvolveram um protocolo de congelamento ultra-rápido para embriões bovinos, que resultou no nascimento do primeiro produto deste método no Brasil. O êxito obtido com congelamento ultra-rápido de embriões tem sido inconstante e ainda carece de estudos. MEZZALIRA *et al.* (1996) obtiveram 19,2% (5/26) de prenhez com a transferência de embriões bovinos produzidos *in vivo* congelados pelo método ultra-rápido com 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose em meio DPBSm (Dulbeccos phosphate-buffered saline modified). Já ALMEIDA (2001) alcançou 14% (1/7) e 40% (2/5) de gestações congelando embriões bovinos, também pelo método ultra-rápido com 2,0M de EG e 0,3M trealose; 3,0M de EG e 0,3M trealose e pelo método rápido (convencional) com 1,5M de etilenoglicol em DPBSm, respectivamente. O reduzido número (2/5) de embriões transferidos por ALMEIDA (2001) não permitiu comprovar a eficiência do método, permanecendo na dependência da continuidade do estudo e do incremento no número de embriões transferidos.

Assim, avaliou-se o efeito da solução de 3,0M de etilenoglicol associado ou não a 0,3M de trealose, em meio de manutenção ECHM-100 Emcare®, no congelamento ultra-rápido de embriões bovinos produzidos *in vivo* sobre a taxa de concepção.

## Material e Método

Vacas da raça Red Angus (n=11) com idade entre 4 e 7 anos, selecionadas quanto a saúde geral e genital e mantidas em pastagem cultivada, serviram como doadoras dos embriões.

A sincronização do ciclo estral das doadoras foi efetuada com implante auricular com Norgestomet<sup>2</sup>, por 8 dias consecutivos, associado à aplicação de 5mg de valerato de estradiol e 3mg de norgestomet IM. A superovulação foi iniciada no 5º dia após a aplicação do implante, com 300UI de FSHp<sup>3</sup>, em doses decrescentes, por via IM, duas vezes ao dia, com intervalo de 12h, por 4 dias consecutivos. No 8º dia, juntamente com a sétima dose de FSH aplicou-se 0,5mg de um análogo de prostaglandina F<sub>2</sub> alfa<sup>4</sup>. Os implantes de progesterona foram retirados no 8º dia, imediatamente após a aplicação da 8ª dose de FSH. As inseminações foram efetuadas 12 e 24h após o início do cio, com sêmen congelado de um touro Red Angus com fertilidade comprovada. A coleta dos embriões foi realizada pelo método não-cirúrgico, 7 dias após a inseminação artificial.

A coleta dos embriões foi efetuada via não-cirúrgica, com DMPBS modificado e auxílio de equipo e filtro<sup>5</sup>. A identificação embrionária foi conduzida em estereomicroscópio<sup>6</sup>. Para lavagem e classificação adotou-se os critérios recomendados pela IETS (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998). Embriões de qualidade excelente (I) e boa (II) foram congelados

---

<sup>2</sup> Crestar® – Intervet International B.V. Boxtmeer – Holland. Representante no Brasil – AKZO NOBEL LTDA – Divisão Intervet. Rua Cel. Bento Soares, 530 Cruzeiro/SP. Brasil

<sup>3</sup> PLUSET® – Calier do Brasil - Av. Manoel Pedro Pimentel, 15 Osasco/SP. Brasil

<sup>4</sup> Sincrocio – OUROFINO SAÚDE ANIMAL – Rua Marechal Mascarenhas de Moraes, 200 Ribeirão Preto/SP. Brasil

<sup>5</sup> Milipore - Nutricell Nutrientes Celulares - Rua Dimas de Toledo Piza, 521, Jardim Nossa Senhora Auxiliadora – Campinas/SP. Brasil

<sup>6</sup> Wild Heerbrugg Ltd – CH – 9495 Heerbrugg, Suíça.

em solução de manutenção ECHM-100 Emcare®<sup>7</sup> + etilenoglicol associado ou não a trealose.

### **Congelamento e transferência dos embriões**

Para o congelamento ultra-rápido, os embriões foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos e expostos às soluções crioprotetoras de 3,0M de etilenoglicol em solução Emcare ECHM-100 (Tratamento 1; n= 46) e 3,0M etilenoglicol + 0,3M de Trealose em solução Emcare ECHM-100 (Tratamento 2; n= 51), por 2 minutos. Durante este período, os embriões foram envasados individualmente em palhetas de 0,25cc, cujas extremidades foram preenchidas com meio de manutenção Emcare ECHM-100, lacradas em seladora pelo calor e identificadas. As palhetas foram expostas por 20 segundos ao vapor do nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) sobre uma plataforma de isopor com 1cm de altura, submersas imediatamente no N<sub>2</sub> líquido e mantidas em raques identificadas e armazenadas em containers de N<sub>2</sub> líquido. As soluções crioprotetoras utilizadas nos tratamentos 1 e 2 (técnica ultra-rápida) foram preparadas no Laboratório de Embriologia Animal – Embryolab, adicionando-se à solução de manutenção Emcare ECHM-100 etilenoglicol<sup>8</sup> e trealose<sup>9</sup>.

Como receptoras, foram selecionadas novilhas e vacas cruza Nelore, com um escore corporal médio 3,0 (escala de 1 a 5 sendo 1=extremamente magra e 5=obesa). A sincronização foi efetuada com pessários intravaginais (PV) de progesterona<sup>10</sup> e aplicação de estrógeno<sup>11</sup> (=D0) via IM, na dose de 2mg. Decorridos 9 dias (D9), os animais receberam um análogo da prostaglandina<sup>12</sup> na dose de 0,5mg, via IM,

---

<sup>7</sup> Emcare® – ECHM-100, Immuno-Chemical Products LTD. Nova Zelândia.

<sup>8</sup> Sigma Chemical CO. P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178 USA. Ref. E-9129

<sup>9</sup> Sigma Chemical CO. P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178 USA. Ref. E-5251

<sup>10</sup> EMBRAPA Pecuária Sul – BR 153, Km 595 Caixa Postal 242 Bagé/RS. Brasil

<sup>11</sup> EMBRAPA Pecuária Sul – BR 153, Km 595 Caixa Postal 242 Bagé/RS. Brasil

<sup>12</sup> Sincrocio - OUROFINO SAÚDE ANIMAL – Rua Marechal Mascarenhas de Moraes, 200, Ribeirão Preto/SP. Brasil

concomitante à retirada dos PV. A observação do rebanho iniciou-se em 36h para identificação dos sinais de cio.

Todas as receptoras receberam anestesia epidural com lidocaína a 2% sem vasoconstritor, na dose de 100mg/animal. Os embriões foram descongelados por 12 segundos no ar e 12 segundos em banho-maria a 30°C, em três datas distintas, na primavera/2004 e verão/2005.

A transferência embrionária (TE) foi efetuada por 2 profissionais, para as receptoras com assincronia máxima de cio de  $\pm 24$ h, no dia 7 (D7), considerando-se D0, o dia da identificação do cio. A técnica de TE foi a não-cirúrgica transcervical, com inovulador, bainha de TE<sup>13</sup> e camisa sanitária<sup>14</sup>. Os embriões foram depositados no corno uterino *lpsis lateralis* ao ovário com corpo lúteo num período não superior a 4 minutos, após descongelamento.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia<sup>15</sup> aos 21 dias pós-transferência embrionária.

### **Análise Estatística**

Os dados foram processados pelo programa estatístico SAS (SAS, 1998) e os resultados foram submetidos ao teste  $X^2$ . Para comparação das médias foi utilizado o nível de significância de 5%.

---

<sup>13</sup> Cultilab – Materiais para cultivo celular Ltda. Av. Barão de Itapuna, 703 – Botafogo 13020-431 Campinas/SP. Brasil.

<sup>14</sup> Overleeve sanitary chemise (IMV) – 11725 95<sup>th</sup> Avenue North, Maple Grove MN 55369. USA.

<sup>15</sup> Pie Medical Imaging – Becanusstraat 13D, Maastricht Zip 6216BX. Holanda.

## Resultados e Discussão

Os resultados de prenhez após transferência direta dos embriões descongelados no experimento são apresentados na tabela 1. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos.

Tabela 1. Índice de prenhez por ultra-sonografia, aos 28 dias, de embriões bovinos produzidos *in vivo* e congelados pelo método ultra-rápido

Tratamentos				Embriões transferidos	Receptoras prenhes aos 28 dias
				n	n(%)
Solução Etilenoglicol 3,0M	ECHM-100	Emcare®	+	46	7 (15,21) <sup>a</sup>
Solução Etilenoglicol 3,0M + Trealose 0,3M	ECHM-100	Emcare®	+	51	7 (13,72) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais, na coluna, não diferem entre si ( $P>0,05$ ).

Na tabela 2 estão relacionados os resultados do congelamento quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, cuja codificação segue os critérios da IETS, ou seja: Estádio 4 (mórulas), 5 (blastocistos iniciais), 6 (blastocistos) e 7 (blastocistos expandidos).

Tabela 2. Prenhez de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vivo* e congelados pelo método ultra-rápido

Estádio embrionário	Tratamento	Receptoras prenhes aos 28 dias n(%)
4	Solução ECHM-100 Emcare®* + Etilenoglicol 3,0M ECHM-100 +Etilenoglicol 3,0M+Trealose 0,3M	0/10 (0,0)
5	ECHM-100 + Etilenoglicol 3,0M ECHM-100 + Etilenoglicol 3,0M+Trealose 0,3M	7/51 (13,72)
6	ECHM-100 + Etilenoglicol 3,0M ECHM-100 + Etilenoglicol 3,0M+Trealose 0,3M	2/24 (8,33)
7	ECHM-100 + Etilenoglicol 3,0M ECHM-100 + Etilenoglicol 3,0M+Trealose 0,3M	5/12 (41,66)

\* Solução ECHM-100 Emcare® = ECHM-100

Trounson *et al.* (1976) constataram que blastocistos bovinos são menos sensíveis do que mórulas, ao resfriamento até 0°C, por 24 horas. De fato, embriões bovinos contêm uma grande quantidade de gotas lipídicas nos estágios mais precoces de desenvolvimento e à medida que os embriões se desenvolvem e alcançam o estágio de blastocisto, o teor de lipídios diminui, conferindo menor sensibilidade ao congelamento para os estágios mais avançados (MOHR & TROUNSON, 1981). Quando comparou o índice de sobrevivência e desenvolvimento, nos diferentes estágios embrionário pós-descongelamento, Chupin (1986) obteve 17,3% (n=75) de viabilidade para blastocistos iniciais e 56,4% (n=78) para blastocistos expandidos, utilizando no congelamento 2,8M de glicerol + 0,25M de sacarose em PBS.

O índice gestacional obtido com blastocistos expandidos destacou-se sobre os demais estágios de desenvolvimento embrionário (Tabela 2). Neste estudo, fica a esclarecer, se a fase de desenvolvimento embrionário

foi responsável pela maior concepção. Deve-se, considerar que número de embriões transferidos no estádios de mórula e blastocisto expandido não é representativo para uma análise definitiva. No futuro, este parâmetro deverá ser avaliado para otimização do resultados.

SOMMERFELD & NIEMANN (1999) testaram várias concentrações de etilenoglicol (entre 3,6M a 7,2M), constatando que 3,6M de etilenoglicol foi atóxico e compatível com taxas de sobrevivência adequadas, enquanto que concentrações maiores de etilenoglicol (7,2M) prejudicaram o desenvolvimento embrionário bovino.

A presença de trealose na solução crioprotetora restringe o movimento de água através das membranas, prevenindo a lise dos blastômeros na difusão do crioprotetor para o espaço extracelular (MASSIP *et al.*, 1987). Os protocolos de congelamento ultra-rápido, descritos na literatura, empregam soluções concentradas de crioprotetores e açúcares que promovem desidratação rápida das células, que ficariam suficientemente permeadas pelo crioprotetor para tolerar a exposição ao vapor de nitrogênio ou a imersão direta no nitrogênio líquido (SCHNEIDER & MAZUR, 1984; VAJTA *et al.*, 1998).

ALMEIDA em 2001 expôs embriões bovinos por 2min às soluções de 2,0M EG + 0,3M trealose e 3,0M EG + 0,3M trealose e 2min ao vapor de N<sub>2</sub> líquido obtendo 17% (n=5/25) e 13% (n=3/24) de gestações, respectivamente. Ao reduzir a exposição dos embriões ao vapor de N<sub>2</sub> líquido para 20s, o referido autor obteve 40% de gestação com os 5 embriões congelados em 3,0M EG + 0,3M trealose. No presente experimento (Tabela 1), os índices foram menores aos 40% obtidos por ALMEIDA (2001), que não transferiu um número expressivo de embriões.

Se avaliarmos os resultados de BERNARDI *et al.* (1991) com 20% e MEZZALIRA *et al.* (1996) com 19,2% de gestações com o congelamento ultra-rápido de embriões bovinos em glicerol e sacarose, os índices foram aproximados. Em ambos estudos, a rehidratação foi efetuada em sacarose, diferentemente do presente experimento.



Embora o índice de gestações tenha sido relativamente baixo, o método permitiu viabilidade embrionária pós-transferência. O método deve ser aprimorado antes de indicar seu uso no congelamento comercial de embriões bovinos.

### **Conclusões**

O protocolo de congelamento ultra-rápido utilizado mostrou-se viável para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* para transferência direta.

O índice de gestação obtido com 3,0M de etilenoglicol, associado ou não, a 0,3M de trealose na solução de congelamento de embriões bovinos produzidos *in vivo*, foi similar.

### **Referências**

ALMEIDA, N.V. **Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol e trealose**. 2001. 26f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., MEZZALIRA, A. Avaliação de diferentes concentrações de sacarose e lactose associadas a glicerol 2.0M no congelamento ultra-rápido de mórulas *Mus musculus*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, n.14, v.2, p.135-148., 1990.

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., METZDORF, A. Congelamento ultra-rápido de embriões *Mus musculus* com a utilização de sacarose e lactose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.3, p.329-332, 1992.

BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; COSTA, C.P.D. *et al.* Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos: primeiro terneiro obtido no Brasil. VI Reunião Anual da SBTE, 2426 de agosto 1991, Curitiba, PR. **Anais...**p.51, 1991.

CHUPIN, D. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. **Theriogenology**, New York, v.27, n.1, p.219, 1987.

CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts. **Theriogenology**, New York, v.25, n.1, p.147, 1986.

CHUPIN, D.; DE REVIERS, M.M. Quick freezing of rat embryos. **Theriogenology**, New York, v.26, n.2, p.157-166. 1986.

DOCHI, O.; IMAI, K.; TAKAHURA, H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. **Anim. Reprod. Sci.** Amsterdam, v.38, p.179-185, 1995.

LANGIS, R. & STEPONKUS, P.L. The toxic of vitrification solutions as determined by their osmotic potential. **Cryobiology**, Orlando, v.27, p.654-655, 1990.

MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, New York, v.27, n.1, p.69-76, 1987.

McINTOCH, A.; HAZELEGER, N.L. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.41, p.253 abst., 1994.

MEZZALIRA, A. & RUBIN, M.I.B. Ultra-rapid freezing and transfer of mouse morulae. **Theriogenology**, New York, v.37, n.1, p.257, 1992.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; SILVA, L.F.A. *et al.* Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.24, p.259 (abstract). 1996.

MOHR, L.R.; TROUNSON, A.O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. **Biol. of Reprod.**, Madison, v.25, p.1009-1025, 1981.

RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. Orlando, v.24, p.387-402, 1987.

RAYOS, A.A., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. **Theriogenology**, New York, n.37, p.595-603, 1992.

RENARD, J. P., BUI-XUAN-NGUYEN, N., GARNIER, V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. **J. Reprod. Fert.**, Colchester, v.71, p.573-580, 1984.

SAHA, S.; OTOI, T.; TAKAGI, M.; BOEDIONO, A. *et al.* Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. **Cryobiology**, Orlando, v.33, p.291-299, 1996.

SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide**: Statistical Analysis System, Release 6.12-1998.

SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relationship to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, New York, v.21, n.1, p.68-79, 1984.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, Orlando, v.38, p.95-105, 1999.

STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos *in vivo*. In: **STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. eds. MANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**, cap.9, p.109-122, 1998.

SUZUKI, T., TAKAGI, M., YAMAMOTO, M. BOEDIONO, A., SAHA, S., SAKAKIBARA, H., OE, M. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. **Theriogenology**, New York, v.40, n.3, p.651-659, 1993.

TAKEDA, T., ELDBEN, R.P., SEIDEL Jr., G.E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. **Theriogenology**, New York, v.21, n.1, p.266, 1984.

TROUNSON, A.O.; WILLADSEN, S.M.; ROWSON, L.E.A. The influence of *in vitro* culture and cooling on the survival and development of cow embryos. **J. Reprod. Fert.**, Colchester, v.47, p.367-370, 1976.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, Hoboken, v.51, n.1, p.53-58, 1998.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.37, p.23-37, 1992.

YOON, Y.H., POPE, J.M., WOLFE, J. The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. **Biophysical Journal**, v.74, p.1949-1965, 1998.

## 4 – CONCLUSÕES

O protocolo de congelamento ultra-rápido mostrou-se viável para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* para transferência direta.

O índice de gestação obtido com 3,0M de etilenoglicol, associado ou não, a 0,3M de trealose na solução de congelamento de embriões bovinos produzidos *in vivo*, foi similar.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, N.V. **Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol e trealose**. 2001. 26f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BAUTISTA, J.A. & KANAGAWA, H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. **Jpn. J. Vet. Res.**, v.45, n.4, p.183-191, 1998.

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., MEZZALIRA, A. Avaliação de diferentes concentrações de sacarose e lactose associadas a glicerol 2.0M no congelamento ultra-rápido de mórulas *Mus musculus*. *Rev Brás. Reprod. Anim.*, n.14, v.2, p.135-148., 1990.

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., METZDORF, A. Congelamento ultra-rápido de embriões *Mus musculus* com a utilização de sacarose e lactose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.3, p.329-332, 1992.

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., COSTA, C.P.D. *et al.* Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos: primeiro terneiro obtido no Brasil. VI Reunião Anual da SBTE, 24-26 de agosto 1991, Curitiba, PR. **Anais...**p.51. 1991.

BIRCH, G.G. Trehalose. In: WOLFROM, M. L., TYSON, R.S. (editores), *Advances in Carbohydrate Chemistry*. **Academic Press**, New York, v.18, p.49-53, 1963.

CHUPIN, D. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.219, 1987.

CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.147, 1986.

CHUPIN, D., DE REVIERS, M.M. Quick freezing of rat embryos. **Theriogenology**, v.26, n.2, p.157-166, 1986.

DOCHI, O., IMAI, K., TAKAHURA, H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. **Anim. Reprod. Sci.** v.38, p.179-185, 1995.

ELBEIN, A. D. The metabolism of  $\alpha,\alpha$ -trehalose. In: TIPSON, R. S., HORTON, D. (editores). *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. **Academic Press**, New York, v.30, p.227-256, 1974.

EROGLU, A., RUSSO, M. J., BIEGANSKI, R. et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v.18, p.163-167, 2000.

FAHY, G.M., LEVY, D.I., ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.24, p.196-213, 1987.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.

GUO, N., PUHLEV, I., BROWN, D.R. et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. **Nature Biotechnology**, v.18, p.168-171, 2000.



HOTAMISLIGIL, S., MEHMET, T., POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and development potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v.55, n.1, p.161-168, 1996.

HVIDT, A. & WESTH, P. Stabilization and destabilization of protein conformations. In: **Protein interactions**. Ed. H. Visser, VCH, Weinheim, Germany, p.327-343, 1992.

KRAG, K.T., KOEHLER, I-M., WRIGHT Jr., RW. A nonpermeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. **Cryobiology**, v.22, n.6, p.636, 1985.

KULESHOVA, L.L.; MAcFARLANE, D.R., TROUNSON, A.O. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.119-130, 1999.

LANGIS, R. & STEPONKUS, P.L. The toxic of vitrification solutions as determined by their osmotic potential. **Cryobiology**, v.27, p.654-655, 1990.

LEHN-JENSEN, H. Bovine egg transplantation. **Nord. Vet. Med.**, v.32, p.523-532, 1980.

LEIBO, S. P. Equilibrium and non-equilibrium cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.32, n.1, p.85-93, 1989.

LEIBO, S.P., McGRATH, J.J., CRAVALHO, E.G. Microscopic observations of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. **Cryobiology**, v.15, p.257-271, 1978.

LEIBO, S. P. & MAZUR, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIEL, Jr., J.C. **Methods in Mammalian Reproduction**. New York: Academic Press, 1978. Cap. 8, p.178-201.

MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P., ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.69-76, 1987.

MAZUR, P., LEIBO, S.P., CHU, H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, n.71, p.345-355, 1972

McINTOCH, A., HAZELEGER, N. L. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. **Theriogenology**, v.41, p.253, 1994.

MEZZALIRA, A. & RUBIN, M.I.B. Ultra-rapid freezing and transfer of mouse morulae. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.257, 1992.

MEZZALIRA, A., VIEIRA, A.D., SILVA, L.F.A. *et al.* Congelamento ultrarápido de embriões bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.24, p.259, 1996.

MOZZAQUATRO, F.D. **Produção in vitro de embriões bovinos em meio suplementado com soro, BSA ou PVA e congelamento ultrarápido**. Santa Maria, 2004. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

NICOLAJSEN, H. & HVIDT, A. Phase behavior of the system Trehalose-NaCl-Water. **Cryobiology**, v.31, p.199-205, 1994.

RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387-402, 1987.

RALL, W. F. Cryopreservation of oocyte and embryos: Methods and applications. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.237-245, 1992.

RAYOS, A.A., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. **Theriogenology**, n.37, p.595-603, 1992.

RENARD, J. P., BUI-XUAN-NGUYEN, N., GARNIER, V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos alter partial dehydration at room temperature. **J. Reprod. Fert.**, v.71, p.573-580, 1984.

RUDOLPH, A. & CROWE, J. H. Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and praline. **Cryobiology**, v.22, p.367-377, 1985.

SAHA, S. & SUZUKI, T. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos at different ages using one-and three-step addition of cryoprotective addition. **Reprod. Fert. Dev.**, v.9, p.741-746, 1997.

SAHA, S., OTOI, T., TAKAGI, M., BOEDIONO, A. *et al.* Normal calves obtained alter direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. **Cryobiology**, v.33, p.291-299, 1996.

SCHELLANDER, K., PELI, J., SCHMOLL, F., BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.909-915, 1994.

SCHNEIDER, U., MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relationship to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.68-79, 1984.

SCHNEIDER, U. Cryobiological principles of embryo freezing. **Journal of *in vitro* fertilization and embryo transfer**, v.3, n.1, p.3-9, 1986.

SOMMERFELD, V., NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.

SUZUKI, T., TAKAGI, M., YAMAMOTO, M. BOEDIONO, A., SAHA, S., SAKAKIBARA, H., OE, M. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. **Theriogenology**, v.40, n.3, p.651-659, 1993.

TAKEDA, T., ELDBEN, R.P., SEIDEL Jr., G.E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.266, 1984.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect:** Formation of micelles and biological membranes. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 1980.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, n.1, p.53-58, 1998.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H.G., KRUIP, T.H.A.M. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. **Cryobiology**, v.32, p.157-167, 1995.

VOELKEL, S.A. & HU, Y.X., Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.23-37, 1992.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.233, p.125-126, 1972.

WILMUT, I. & ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Vet. Rec.**, v.92, n.26, p. 689-690, 1973.

WOLFE, J. & BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v.39, p.103-129, 1999.