

## CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE SUÍNOS ADICIONANDO TREALOSE AOS CRIOPROTETORES ETILENOGLICOL OU GLICEROL<sup>1</sup>

### CRYOPRESERVATION OF SWINE EMBRYOS ADDING TREHALOSE TO ETHYLENE GLYCOL OR GLYCEROL CRYOPROTECTORS

Edmir da Silva Nicola<sup>2</sup> João Carlos Deschamps<sup>3</sup> Milton Macedo Júnior<sup>4</sup> José Bozato Sobrinho<sup>5</sup>

#### RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram: comparar (a) o efeito da adição de trealose ao crioprotetor etilenoglicol e, (b) o efeito dos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol associados à trealose sobre a viabilidade de embriões congelados de suínos. A trealose foi adicionada à solução de congelamento de etilenoglicol 1.5 M nas concentrações de 0.0 M (tratamento 1) e 0.25 M (tratamento 2), e na concentração de 0.25 M (tratamento 3) à solução de congelamento de glicerol 1.5 M. Os embriões foram congelados no estágio de blastocisto expandido. O método de congelamento utilizado foi o rápido, sendo que desde a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) até a temperatura do "seeding" ( $-7^\circ\text{C}$ ), a velocidade de resfriamento foi de  $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ . Após o "seeding", foi estabelecido um período de equilíbrio de 10 minutos à  $-7^\circ\text{C}$ , sendo, a partir de então, adotada a velocidade de resfriamento de  $0.3^\circ\text{C}/\text{minuto}$  até a temperatura de  $-35^\circ\text{C}$ . A seguir, as palhetas foram colocadas no nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ). O descongelamento foi realizado mediante exposição das palhetas ao ar durante 30 segundos e, posteriormente, em banho-maria à  $35^\circ\text{C}$ , durante 30 segundos. A remoção dos crioprotetores foi realizada pelo método em etapas. O critério de viabilidade adotado consistiu na observação da reexpansão da cavidade blastocélica dos embriões, após período de cultivo *in vitro* de 18-24h. O cultivo foi feito em meio TCM 199 (tissue culture medium), acrescido de 20% de soro fetal bovino, em microgotas de 60  $\mu\text{l}$ , sob óleo mineral em estufa com 6%  $\text{CO}_2$ , 95% de umidade e  $37^\circ\text{C}$ . A viabilidade embrionária logo após o descongelamento (0h) foi de 17.2%, 37.5% e 42.8%, para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Após o período de cultivo de 18-24h, a viabilidade embrionária foi de 6.9%, 28.1% e 28.5%, para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Os resultados indicaram que não houve diferença ( $p>0.05$ ) significativa entre os tratamentos ao descongelamento. Após o cultivo *in vitro*, verificou-se que a porcentagem de embriões viáveis foi superior ( $p<0.05$ ) pela adição de trealose na concentração de 0.25 M à solução de congelamento, contendo

etilenoglicol. No entanto, não foi detectada diferença significativa entre os crioprotetores etilenoglicol ou glicerol, associados à trealose.

**Palavras-chave:** embrião, suíno, criopreservação, trealose.

#### SUMMARY

The objectives of this study were to compare (a) the effects of trehalose incorporated to ethylene glycol and (b) the effect of ethylene glycol and glycerol associated to trehalose on the viability of frozen swine embryos. Treatment 1 consisted in 1.5 M ethylene glycol, treatment 2 in 1.5 M ethylene glycol plus 0.25 M trehalose and treatment 3 glycerol 1.5 M with 0.25 M trehalose. The embryos were frozen at expanded blastocyst stage. The rapid freezing method was used, with a cooling rate of  $1^\circ\text{C}/\text{minute}$  from the room temperature ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) to seeding ( $-7^\circ\text{C}$ ), and of  $0.3^\circ\text{C}/\text{minute}$  to  $-35^\circ\text{C}$ , when the straws were plunged into liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ). Thawing was carried out in air during 30 seconds and in a water bath at  $37^\circ\text{C}$  during 30 seconds. Cryoprotectors were removed by the step-wise method. Embryo viability was observed microscopically immediately after thawing and when they reexpanded after being cultured for 18-24h in Medium 199 with 20% bovine foetal serum in 60  $\mu\text{l}$  drops covered with mineral oil and incubated at  $37^\circ\text{C}$  in air with 6%  $\text{CO}_2$ . The viability was 17.2%, 37.5% and 42.8% immediately after thawing, and 6.9%, 28.1% and 28.5% after a culture period of 18-24h, for treatments 1, 2 and 3, respectively. The results showed no differences ( $p>0.05$ ) in viability among treatments when observation was made immediately after thawing. After culturing, viability rate was higher ( $p<0.05$ ) in ethylene glycol with 0.25 M trehalose than in ethylene glycol only. Ethylene glycol and glycerol associated to trehalose showed no differences to cryoprotect swine embryos.

**Key words:** swine; embryo; cryopreservation; trehalose.

<sup>1</sup>Parte da Dissertação de Mestrado em Zootecnia apresentada pelo primeiro autor pela Faculdade de Agronomia, UFPEL.

<sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), bolsista da CAPES.

<sup>3</sup>Professor Adjunto, Faculdade de Veterinária, UFPEL, 96010-900, Pelotas, RS. Autor para correspondência.

<sup>4</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária, bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

<sup>5</sup>Médico Veterinário.

## INTRODUÇÃO

O congelamento e a transferência de embriões na espécie suína têm como finalidade principal a manutenção do aspecto de biosegurança (DIAL *et al.*, 1992), permitindo a introdução de genótipos superiores em rebanhos livres de patógenos específicos (MARTIN, 1983). No entanto, a aplicabilidade desta técnica não tem dado bons resultados, sendo que os primeiros leitões nascidos da transferência de embriões congelados e descongelados somente foi obtido em 1991, por KASHIWASAKY e colaboradores. A alta sensibilidade do embrião suíno à criopreservação está relacionada com a grande quantidade ou à composição de lipídios presentes em sua estrutura (QUINN, 1992). O embrião de suíno apresenta uma composição específica de lipídios em nível de membrana plasmática, a qual, durante o processo de congelamento, sofre uma separação de fase lateral, formando a chamada fase hexagonal, determinando alterações na sua função primordial de permeabilidade seletiva (PETIT & EDIDIN, 1974). Outro efeito prejudicial causado pelos lipídios ocorre em nível citoplasmático, onde existem muitas gotas, as quais tendem a coalescer durante o resfriamento formando grandes gotas lipídicas, causando alteração da relação espacial das organelas (MOHR & TROUSON, 1981). Considerando o estágio embrionário, trabalhos realizados por NAGASHIMA *et al.* (1989; 1992) comprovaram que a melhor fase para o congelamento corresponde aos estágios de peri-eclosão, ou seja, quando a quantidade de lipídios apresenta-se reduzida no embrião de suíno, minimizando desta maneira os danos causados pelas gotas lipídicas.

O dissacarídeo trealose (TRE), o qual está presente em organismos capazes de tolerar a desidratação, tem como função principal dar estabilidade à membrana plasmática durante os processos de congelamento e descongelamento (CROWE *et al.*, 1987). CAMERON *et al.* (1992) e MARTINEZ *et al.* (1994) observaram que a adição de trealose ao meio de congelamento, contendo glicerol, propiciou um aumento da taxa de sobrevivência de embriões suínos após a criopreservação.

A grande maioria dos trabalhos realizados até o momento com o congelamento de embriões de suínos, utilizou glicerol (GLI) como crioprotetor intracelular de eleição (HAYASHY *et al.*, 1989; KASHIWAZAKY *et al.*, 1991; CAMERON *et al.*; 1992; MARTINEZ *et al.*, 1994). O uso do etilenoglicol (EG) na criopreservação de embriões de bovinos (VOELKEL & HU, 1992; SUZUKI *et al.*, 1993; McINTOSH & HAZELEGER, 1994), caprinos (LE GAL *et al.*, 1993) e ovinos (McGINNIS *et al.*, 1989;

COCERO *et al.*, 1996) através da técnica de congelamento rápido, tem apresentado bons resultados. A principal vantagem atribuída ao etilenoglicol refere-se a sua reduzida toxicidade (WEBER & YOUNGS, 1994), pois possui baixo peso molecular, permitindo uma penetração mais rápida para o interior das células embrionárias, em menor período de tempo e, conseqüentemente, um rápido efluxo após o descongelamento, evitando desta maneira injúrias de origem tóxica e osmótica (KASAI *et al.*, 1992). O uso do etilenoglicol na vitrificação de embriões deslipidizados de 2-4 células de suínos possibilitou o desenvolvimento de 50% dos embriões até o estágio de blastocisto, após o cultivo *in vitro* (NAGASHIMA *et al.*, 1996).

Os objetivos deste trabalho foram comparar (a) o efeito da adição de trealose ao crioprotetor etilenoglicol e, (b) o efeito dos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol associados à trealose, sobre a viabilidade de embriões congelados de suínos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se, como doadoras de embriões, fêmeas F1 (Landrace x Large White) entre 5-10 meses de idade e com peso entre 85-140 Kg. Os animais foram divididos em grupos de 6-8 fêmeas, as quais foram colocadas em baias próximas ao cachaço. A indução de estro e tratamento de superovulação foram realizados mediante a administração via intramuscular de 750 U.I. de gonadotrofina coriônica equina (eCG)<sup>a</sup> associada a 250 U.I. de gonadotrofina coriônica humana (hCG)<sup>b</sup>, seguido de 500 U.I. de hCG, 72h após (MARTINEZ *et al.*, 1994). As inseminações foram realizadas 24-36h após a administração de hCG com sêmen de machos de fertilidade comprovada. O sêmen foi coletado no dia da inseminação pela manhã e diluído em BTS (Beltsville Thawing Solution; PURSEL & JOHNSON, 1975), de modo que cada dose inseminante continha um volume de 80 ml e concentração mínima de 4 bilhões de espermatozóides viáveis. Sete dias após a primeira inseminação artificial (dia 0), as fêmeas foram abatidas no frigorífico e os tratamentos reprodutivos coletados e transportados em caixa térmica em banho-maria à 37°C. O tempo de transporte dos tratamentos reprodutivos, desde o abatedouro até o laboratório, foi em torno de 80 minutos e o tempo para a lavagem de cada útero foi de 15 minutos. A lavagem dos cornos uterinos foi feita injetando-se próximo à junção útero-tubárica 60-80 ml de PBS<sup>c</sup> (solução salina fosfatada) acrescida de 1% de soro fetal bovino (SFB)<sup>d</sup> à 37°C. Foram coletados 39 embriões no estágio de blastocisto expandido, sendo imediatamente congelados, enquanto que 45 em-

brões em estágios anteriores (13 mórulas e 32 blastocistos) foram cultivados *in vitro* até que atingissem a fase desejada para o congelamento. Foram congelados 84 embriões no estágio de blastocisto expandido, classificados como de grau I e II. Inicialmente, os embriões foram expostos a uma solução de congelamento I, constituída de 0.5 M EG<sup>e</sup> (T1), 0.5 M EG + 0.25 M TRE<sup>f</sup> (T2) ou 0.5 M GLI<sup>g</sup> + 0.25 M TRE (T3) por um período de 5 minutos. Logo após, foram transferidos para uma solução de congelamento II, constituída de 1.5 M EG (T1), 1.5 M EG + 0.25 M TRE (T2) ou 1.5 M GLI + 0.25 M TRE (T3), por um período de 10 minutos, sendo então acondicionados em palhetas plásticas de 0.25 ml.

O método de congelamento utilizado foi o rápido, sendo que a velocidade de resfriamento desde a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) até a temperatura do seeding ( $-7^{\circ}\text{C}$ ) foi de  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Foi estabelecido um período de equilíbrio de 10 minutos à  $-7^{\circ}\text{C}$ , e logo após seguida a velocidade de  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  até  $-35^{\circ}\text{C}$ , sendo então as palhetas colocadas no nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). O descongelamento dos embriões foi realizado mediante a exposição das palhetas ao ar, durante 30 segundos, e então colocados em banho-maria à  $35^{\circ}\text{C}$ , durante 30 segundos (CAMERON *et al.*, 1992). A remoção do crioprotetor foi feita pelo método em etapas, sendo que para os tratamentos T1 e T2 os embriões foram submetidos as mesmas soluções de descongelamento: SD-I = 0.5 M EG + 0.3 M TRE - 2 minutos; SD-II = 0.2 M TRE - 4 minutos; SD-III = 0.1 M TRE - 5 minutos e SD-IV = PBS + 20% SFB - 5 minutos. O procedimento no tratamento T3 foi o mesmo, exceto que na SD-I foi utilizado 0.5 M GLI. A partir da exposição dos embriões à SD-IV, foi feita a primeira avaliação morfológica (0h), sendo então os embriões imediatamente transferidos para o cultivo *in vitro*, o qual foi realizado em placas de petry com microgotas de  $60\ \mu\text{l}$  de meio 199<sup>h</sup> sob óleo mineral em estufa com 5% CO<sub>2</sub> à  $37^{\circ}\text{C}$ , durante um período de 18-24h, após o qual foi realizada a segunda avaliação morfológica. O critério de viabilidade foi baseado na observação da reexpansão dos blastocistos expandidos durante o cultivo *in vitro* (NAGASHIMA *et al.*, 1992).

Os resultados de viabilidade embrionária foram analisados através do teste do qui-quadrado (STATISTIX, Analytical software, version 4.1).

## RESULTADOS

Dos 84 embriões congelados de suínos no estágio de blastocisto expandido, 82 foram descongelados e avaliados sob o aspecto morfológico após o cultivo *in vitro*. A diferença observada entre o

número de embriões congelados e avaliados deve-se a perdas ocorridas (2 embriões referentes ao tratamento 3) durante o descongelamento.

A presença de trealose no meio de congelamento, independente do crioprotetor (etilenoglicol ou glicerol), determinou maior ( $p < 0.05$ ) taxa de sobrevivência embrionária (Tabela 1).

Não foi observada diferença ( $p > 0.05$ ) nas taxas de viabilidade embrionária entre os crioprotetores etilenoglicol e glicerol associados à trealose (T2 x T3). Verificou-se que nenhum embrião sofreu eclosão após o período de cultivo de 18-24h.

## DISCUSSÃO

Os percentuais de viabilidade embrionária deste experimento estão próximos aos resultados obtidos por MARTINEZ *et al.* (1994), os quais obtiveram 20.5% de sobrevivência (8/39), utilizando trealose na concentração de 0.25 M no meio de congelamento de embriões de suínos. O efeito crioprotetor da trealose associada ao glicerol ou etilenoglicol, provavelmente é devido à manutenção da fluididade da membrana plasmática, como sugerido por CROWE *et al.* (1987).

A baixa taxa de sobrevivência obtida no presente experimento pode ser, em parte, atribuída ao uso exclusivo de embriões na fase de blastocisto expandido, pois a fase de blastocisto eclodido apresenta melhor eficiência no congelamento, conforme demonstrado por KASHIWAZAKI *et al.* (1991) utilizando a técnica de congelamento rápido, e também por DOBRINSKY & JOHNSON (1994), utilizando a técnica de vitrificação, sendo obtido por ambos grupos 39% de viabilidade embrionária após

Tabela 1 - Avaliação do desenvolvimento *in vitro* de embriões congelados de suínos em meio contendo trealose (TRE) associada à etilenoglicol (EG) ou glicerol (GL).

| TRATAMENTO | VIABILIDADE EMBRIONÁRIA (%) |             |                 |
|------------|-----------------------------|-------------|-----------------|
|            | n                           | 0h<br>N (%) | 18-24h<br>N (%) |
| T1         | 29                          | 5 (17,2) a  | 2 (6,9) a       |
| T2         | 32                          | 12 (37,5) b | 9 (28,1) b      |
| T3         | 21                          | 9 (42,8) b  | 6 (28,5) b      |

T1=EG + TRE (0.0 M); T2= EG + TRE (0.25 M); T3= GL + TRE (0.25 M)

\* Valores seguidos por letras diferentes em colunas diferem ( $p < 0.05$ ) pelo teste do qui-quadrado.

o descongelamento e cultivo *in vitro* de blastocistos eclodidos. Em contrapartida, considerando o aspecto de biosegurança, a fase de blastocisto expandido, ao contrário da fase de blastocisto eclodido, apresenta a zona pelúcida intacta, protegendo o embrião contra agentes infecciosos (WRATHALL & STRINGFELLOW, 1995).

O cultivo *in vitro* antes do congelamento de embriões nas fases de mórula e blastocisto não teve efeito sobre o desenvolvimento embrionário após a criopreservação, confirmando os resultados de DOBRINSKY & JOHNSON (1994). No presente experimento, somente 50% dos tratamentos reprodutivos foram lavados dentro do período de 2h após o abate, para a obtenção dos embriões, período considerado como ideal para que não seja afetada a viabilidade futura dos mesmos (WOLLENBERG *et al.*, 1990). Entretanto, o impacto do tempo de coleta sobre a viabilidade dos embriões foi, minimizado, uma vez que embriões foram distribuídos de forma aleatória dentro de cada tratamento.

Embora ainda não exista um meio padrão para o cultivo de embriões de suínos, o meio 199 tem sido o mais utilizado. Entretanto, WHEELER (1997) não o considera como um meio ideal para o cultivo de embriões de suínos, o que pode, em parte, ter afetado o potencial de eclosão dos embriões após o período de cultivo *in vitro*.

Deve ser considerado que a avaliação morfológica na determinação da viabilidade embrionária é um critério subjetivo, o qual possibilita uma estimativa visual do grau de integridade celular, não fornecendo, porém, informações sobre seu real potencial de desenvolvimento *in vivo*. Neste sentido, podem também ser utilizados outros métodos alternativos de avaliação *in vitro*, como a contagem de células da massa celular interna e trofoblasto, avaliação do metabolismo e taxa respiratória embrionária, ou adoção de um sistema de avaliação conjunta dessas técnicas, o que permitiria uma estimativa da viabilidade embrionária mais confiável (OVERSTROM, 1996). Entretanto, o ideal é que a avaliação da viabilidade de embriões congelados e descongelados seja executada através do desenvolvimento *in vivo*, após a transferência dos embriões para uma receptora.

A partir dos resultados obtidos no presente experimento, conclui-se que a presença de trealose na concentração de 0.25 M no meio de congelamento de embriões de suínos, no estágio de blastocisto expandido, determinou aumento da viabilidade embrionária, independente do crioprotetor (glicerol ou etilenoglicol), e que as taxas de sobrevivência embrionária entre os crioprotetores glicerol e etilenoglicol associados à trealose não diferiram entre si.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

- <sup>a</sup>PMSG CAL 5000 U.I., Cientistas Associados/Produtos Biológicos LTDA.  
<sup>b</sup>VETECOR - Sero  
<sup>c</sup>PBS - Cultilab  
<sup>d</sup>SFB - Cultilab  
<sup>e</sup>ETILENOGLICOL - Reagen  
<sup>f</sup>TREALOSE - Sigma  
<sup>g</sup>GLICEROL - Synth  
<sup>h</sup>MEIO 199 - Cultilab

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMERON, R.D.A., LISING, R., NAGASHIMA, H., *et al.* Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. **International Pig Veterinary Society, Proceeding**, p. 476, 1992.
- COCERO, M.J., SEBASTIAN, A.L., BARRAGAN, M.L. *et al.* Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. **Cryobiology**, v. 33, p. 502-507, 1996.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F. *et al.* Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. **Bioch J**, v. 242, p. 1-10, 1987.
- DIAL, G.D., WISEMAN, B.S., DAVIES, P.R. *et al.* Strategies employed in the USA for improving the health of swine. **Pig News and Information**, v. 13, p. 111N-123N, 1992.
- DOBRINSKY, J.R., JOHNSON, L.A. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of *in vitro* development. **Theriogenology**, v. 42, p. 25-35, 1994.
- HAYASHI, S., KOBAYASHI, K., MIZUNO, J., SAITOH, K. *et al.* Birth of piglets from frozen embryos. **Vet Record**, v. 125, p. 43-44, 1989.
- KASAI, M., HAMAGUCHI, S.E., ZHU, T. *et al.* High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Biol Reprod**, v. 46, p. 1042-1046, 1992.
- KASHIWAZAKI, N., OHTANI, S., MIYAMOTO, K. *et al.* Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. **Vet Rec**, v. 16, p. 256-257, 1991.
- LEGAL, F., BARIL, G., VALLET, J.C. *et al.* *In vivo* and *in vitro* survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. **Theriogenology**, v. 40, p. 771-777, 1993.
- MARTIN, P.A. Commercial embryo transfer in swine: Who is interested in it and why. **Theriogenology**, v. 19, p. 43-48, 1983.
- MARTINEZ, M.D., BORDIGNON, V., NICOLA, E.S. *et al.* Effect of trehalose on the viability of swine and mouse frozen embryos. **J Anim Sci (Sup. 1)**, v. 72, p. 309, 1994.
- McGINNIS, L.K., DUPLANTIS, S.C., WALLER, S.L. *et al.* The use of ethylene glycol for cryopreservation of sheep embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 226, 1989.
- McINTOSH, A., HAZELEGER, N.L. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 253, 1994.

- MOHR, L.R., TROUSON, A.O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. **Biol Reprod**, v. 25, p. 1009-1025, 1981.
- NAGASHIMA, H., KATO, Y., MATSUMOTO, T. *et al.* Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stage. **Jpn J Anim Reprod**, v. 35, p. 130-134, 1989.
- NAGASHIMA, H., KUWAYAMA, M., GRUPEN, C.G. *et al.* Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. **Theriogenology**, v. 45, p. 180, 1996.
- NAGASHIMA, H.; YAMAKAWA, H. & NIEMANN, H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. **Theriogenology**, v. 37, p. 839-850, 1992.
- OVERSTROM, E.W. In vitro assessment of embryo viability. **Theriogenology**, v. 45, p. 3-16, 1996.
- PETIT, V.A.; EDIDIN, M. Lateral phase separation of lipids in plasm membranes: effect of temperature on the mobility of membrane antigens. **Science**, v. 184, p. 1183-1185, 1974.
- PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing proecedure. **J Anim Sci**, v. 40, p. 99-101, 1975.
- QUINN, P.J. Modulation of membrane lipid phase behaviour by chemical modification *in situ*. In: QUINN, P.J.; CHERRY, R.J. (ed), **Structural an dynamic properties of lipids and membranes**. London, UK: Portland Press, 29-50, 1992.
- STATISTIX, VERSION 4.1 - **User's manual - Analytical software**: Tallahassee, FL, p. 231-234, 1994.
- SUZUKI, T., TAKAGI, M., YAMAMOTO, M. *et al.* Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized and thawed using a one-step system. **Theriogenology**, v. 40, p. 651-659, 1993.
- VOELKEL, S.A., HU, Y.X. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. **Theriogenology**, v. 37, p. 687-697, 1992.
- WEBER, P.K., YOUNGS, C.R. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 1291-1298, 1994.
- WOLLENBERG, C., WENTZ, I., BLUM, B. *et al.* Survival of pig embryos flushed from the reproductive tract immediately or two hours after slaughter of donors. **J Anim Sci**, v. 68, p. 2023-2026, 1990.
- WHEELER, M. -1997 - Comunicação pessoal.
- WRATHALL, A.E., STRINGFELLOW, D.A. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. **Theriogenology**, v. 43, p. 89-96, 1995