

Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método *one-step* com etilenoglicol*

CORRESPONDÊNCIA PARA:
José Antonio Visintin
Departamento de Reprodução
Animal
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP
Av. Orlando Marques de Paiva, 87.
05508-000 - São Paulo - SP
e-mail: visintin@usp.br

Superovulation of Nelore heifers with different FSH/LH doses and embryo freezing by one-step method with ethylene-glycol

1-Departamento de Reprodução
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da USP-SP

José Antonio VISINTIN; Rubens Paes de ARRUDA¹; Ed Hoffman MADUREIRA¹; Katia MIZUTA¹;
Eneiva Carla Carvalho CELEGHINI¹; Mayra Elena Ortiz D'Avila ASSUMPÇÃO¹; Pedro Paulo Gimenes GUSMÕES¹;
Pedro Henrique CANDINI¹

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo identificar a dose mais eficiente de FSH/LH (300, 400 e 500 UI) no tratamento superovulatório de novilhas da raça Nelore, assim como avaliar o método *one-step* no processo de congelamento de embriões. A variação da resposta superovulatória tem sido muito grande, o que explica o interesse de diversos pesquisadores em encontrar novos hormônios, doses e momentos para realizar a estimulação ovariana. Foram empregadas doses de 300 (n = 20), 400 (n = 21) ou 500 UI (n = 21) de FSH/LH, iniciando-se no décimo dia do ciclo estral, em 8 aplicações decrescentes, durante quatro dias consecutivos. Foi aplicado PGF₂ concomitante com a quinta subdose de FSH/LH e realizadas duas inseminações artificiais às 12 e às 24 horas após o início dos sintomas de estro. As colheitas dos embriões foram realizadas 6,5 dias após a primeira inseminação artificial. Pelo exame ultra-sonográfico, avaliaram-se os números de folículos no momento da inseminação artificial (15,12; 15,76; e 14,94) e de corpos lúteos (10,68; 11,55; e 10,81) no dia da colheita, encontrando 5,20; 1,81; e 2,76 embriões viáveis, respectivamente, para 300 UI, 400 UI e 500 UI de FSH/LH. O grupo de 300 UI de FSH/LH apresentou os melhores resultados em relação aos embriões viáveis. Dos 106 embriões congelados pelo método *one-step* em 1,5 M de etilenoglicol e transferidos pelo método não-cirúrgico, 8 resultaram em prenhez (7,5%). A dose de 300 UI de FSH/LH apresentou melhor resposta superovulatória em comparação com as de 400 e 500 UI para novilhas da raça Nelore. A transferência de embriões *Bos taurus indicus* congelados pelo método *one-step* em 1,5 M de etilenoglicol não foi eficiente.

UNITERMOS: Superovulação; Embriões; Etilenoglicol; Bovinos.

INTRODUÇÃO

A variação do número de embriões após diferentes tratamentos superovulatórios tem sido atribuída a fatores individuais. Monniaux *et al.*¹⁶, Moor *et al.*¹⁷ e Murphy *et al.*¹⁸, utilizando tratamentos idênticos, obtiveram respostas altamente variáveis. Em relação às concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) presentes no extrato pituitário comumente usado para estimular a resposta ovulatória, Greve *et al.*⁶, Moor

*et al.*¹⁷, Callesen *et al.*¹ e Foote; Ellington⁵ encontraram melhores resultados em preparações com baixa concentração de LH. Estes autores salientam que as altas concentrações de LH causam ovulação prematura ou luteinização de folículos, ocasionando baixa resposta superovulatória. Hasler *et al.*⁷ relataram que 14% dos animais superovulados em rebanhos leiteiros não responderam ao tratamento.

A administração do FSH para estimular a superovulação deve ser feita durante 4 a 5 dias, em intervalos de 12 horas, porque, segundo Moor *et al.*¹⁷, o FSH possui vida-média curta

*Este trabalho foi financiado pelo CNPq nº 52/0333-942 e pela Finep

(110 minutos). Demoustier *et al.*² relataram que a concentração plasmática de FSH aumenta imediatamente após sua administração (intramuscular), atingindo a concentração máxima às 3 horas e diminuindo gradualmente até não ser mais detectada às 12 horas.

Zanenga; Silva²⁵ não encontraram redução no número de embriões viáveis em fêmeas *Bos taurus indicus* em superovulações consecutivas.

A criopreservação tem como finalidade viabilizar economicamente a biotecnologia da transferência de embriões. Este processo permite o armazenamento de embriões por tempo indeterminado, eliminando a necessidade de sincronizar o ciclo estral entre doadoras e receptoras; o planejamento de partos em épocas ideais, tanto para bovinos de leite quanto de carne; o transporte de embriões para diferentes locais; e a realização de experimentos nas áreas de melhoramento genético.

Várias substâncias foram empregadas para proteger as células contra os danos da congelação, sendo classificadas como crioprotetores penetrantes (DMSO, glicerol, etilenoglicol, 1,2-propanodiol), que reduzem a formação de gelo no interior das células durante a congelação e não-penetrantes, podendo ser macromoléculas de baixo peso molecular (sacarose) que promovem a desidratação por contração das células antes da congelação ou de alto peso molecular (polivinilpirrolidona, dextran, soro sangüíneo, soro albumina bovina), que mostram eficiência na reparação de danos da membrana celular^{10,26}. Os crioprotetores possuem funções como o abaixamento do ponto de congelação das soluções, a interação com a membrana celular tornando-a menos quebradiça à congelação e a diminuição do efeito das altas concentrações de solutos durante a desidratação das células²⁶.

O processo de congelação de embriões bovinos vem sendo simplificado nos últimos anos, pois os métodos tradicionais de criopreservação são laboriosos, requerendo que o embrião, após a descongelação, seja removido da palheta e manipulado antes da transferência para a receptora, o que exige tempo, pessoal e infra-estrutura especializados¹⁴. Para encontrar um método mais simples para viabilizar a transferência de embriões a campo, estão sendo estudados processos que permitam a adição e a remoção do crioprotetor em uma única etapa (*one-step*). Um dos procedimentos foi a colocação de solução de sacarose nas extremidades da própria palheta e o outro a utilização de crioprotetores mais permeáveis às células embrionárias^{11,15,24}.

Para estudar a viabilidade do método *one-step*, Leibo¹¹ congelou embriões de vacas da raça Simental em solução contendo 1,5 M de glicerol e 1,08 M de sacarose, obtendo taxa de 34,9% de prenhez. Massip *et al.*¹⁴ e Touati *et al.*²² usaram 1,36 M de glicerol e 0,25 M de sacarose, conseguindo taxas de prenhez de 50,0% e 55,6%, respectivamente. Jaume;

Campos⁸, utilizando o metanol como crioprotetor para embriões de camundongos e de bovinos, conseguiram média de 53,5% de desenvolvimento embrionário em camundongos, enquanto os embriões bovinos permaneceram viáveis em metanol somente à temperatura ambiente, não sobrevivendo à congelação e à descongelação. Suzuki *et al.*¹⁹ relataram melhores taxas de sobrevivência e de prenhez com embriões bovinos congelados pelo método *one-step* em 1,6 M de 1,2-propanodiol do que com 1,4 M de glicerol. A adição de sacarose aos crioprotetores provocou melhora na taxa de sobrevivência de embriões congelados em glicerol, enquanto em 1,2-propanodiol não apresentou alteração.

Voelkel; Hu²⁴ concluíram que a congelação de embriões pelo método *one-step* em 1,5 M de etilenoglicol foi melhor do que 1,4 M de glicerol; 1,5 M de DMSO ou 1,5 M de 1,2-propanodiol, quando cultivaram os embriões *in vitro*. No entanto, avaliando a eficiência de 1,5 M de etilenoglicol na congelação, descongelação e transferência pelo método *one-step*, obtiveram taxas de prenhez iguais aos embriões congelados em 1,4 M de glicerol pelo método convencional. Embora estes resultados sejam semelhantes, o etilenoglicol é mais vantajoso, em decorrência da praticidade do método. Lange⁹, congelando embriões bovinos em 1,5 M de etilenoglicol pelo método *one-step* e em 1,4 M de glicerol pelo método de remoção do crioprotetor em três etapas com sacarose (controle), obteve taxas de prenhez de 58,2% e 48,9%, respectivamente. Looney *et al.*¹³ alcançaram taxas de prenhez mais altas com embriões congelados em 10% de glicerol (69,6%) do que em 1,5 M de etilenoglicol (50%).

Suzuki *et al.*²⁰, empregando o método *one-step*, avaliaram os crioprotetores 1,3 M de metilcelulose, 1,1 M de dietilenoglicol, 1,8 M de etilenoglicol, 1,6 M de 1,2-propanodiol e 1,1 M de 1,3-butilenoglicol, indicando que metilcelulose, dietilenoglicol, etilenoglicol e 1,2-propanodiol mostraram ser úteis para a congelação de embriões bovinos fecundados *in vitro*, sendo que 1,8 M de etilenoglicol apresentou a maior taxa de prenhez. De acordo com Zanenga²⁶, as primeiras tentativas de congelação de embriões zebuínos no Brasil empregaram o processo de várias etapas com glicerol, mas posteriormente foram preconizadas modificações, usando-se a sacarose após a descongelação. Molina; Saturnino¹⁵, objetivando desenvolver o método *one-step* para congelação de embriões de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), utilizaram 1,36 M de glicerol com 0,25 M de sacarose e 10% de SFB em PBS, não conseguindo prenhez. Esper; Barbosa³, comparando embriões *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, encontraram diferenças significativas entre as células embrionárias quanto ao volume ocupado pelos lípidos, mitocôndrias e lisossomos.

Este experimento teve como objetivo identificar a dose mais eficiente de FSH/LH (300, 400 ou 500 UI) no tratamento

superovulatório de novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), assim como avaliar o método *one-step* no processo de congelamento de embriões.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 24 novilhas da raça Nelore como doadoras de embriões, as quais foram submetidas a tratamentos a cada 2 meses, perfazendo 62 superovulações. Os animais foram superovulados com 300, 400 ou 500 UI de FSH/LH^a, sendo administradas em 8 subdoses decrescentes, com início no 10^o dia após os sintomas de estro, durante 4 dias consecutivos, com intervalo de 12 horas. Foi aplicado PGF_{2a} concomitante com a quinta subdose de FSH/LH^a, realizando-se 2 inseminações artificiais às 12 e às 24 horas após o início dos sintomas de estro.

A resposta superovulatória e o número de corpos lúteos foram avaliados pela ultra-sonografia na inseminação artificial (IA) e no dia da colheita dos embriões, respectivamente. As colheitas de embriões foram realizadas pelo método não-cirúrgico no dia 6,5 após a primeira inseminação artificial com o cateter de Foley 18Fr/ch, fixado no corpo do útero para lavagem simultânea dos dois cornos uterinos, com um litro da solução de PBS acrescida de 1% de soro fetal bovino (SFB). Após a filtragem, o líquido restante no filtro (\pm 20 ml) foi colocado em placas de Petri para localização das estruturas em estereomicroscópio com aumento de 10x. Os embriões foram submetidos a oito lavagens em PBS acrescido de 10% de SFB para retirada de debris celulares e classificados morfológicamente em estereomicroscópio com aumento de 40x, quanto ao estágio de desenvolvimento e a qualidade, de acordo com Lindner; Wright¹².

Tabela 1

Números médios de folículos na inseminação artificial e de corpos lúteos, embriões viáveis e totais no dia da colheita, em novilhas da raça Nelore superovuladas com 300, 400 ou 500 UI de FSH/LH, São Paulo, 1996.

Tratamentos	FSH/LH (UI)			CV
	300	400	500	
Número	20	21	21	
Novilhas em estro	20 (100%)	18 (85,7%)	16 (76,2%)	
Folículos (IA)	15,12	15,76	14,94	28,62
Corpos lúteos	10,68	11,55	10,81	35,60
Embriões viáveis	5,20 ^a	1,81 ^b	2,76 ^b	92,82
Estruturas totais	8,10 ^a	3,95 ^b	6,29 ^{ab}	83,87

IA - inseminação artificial CV - coeficiente de variação;

^{a,b} Linhas com diferentes letras sobrescritas diferem para o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2

Números médios de folículos na inseminação artificial e de corpos lúteos, embriões viáveis e totais no dia da colheita, em novilhas da raça Nelore com ou sem sintomas de estro após os tratamentos superovulatórios com 300, 400 ou 500 UI de FSH/LH. São Paulo, 1996.

Item	Média de Estruturas			
	Média de Folículos	Média de Corpos lúteos	Viáveis	Totais
Com estro	15,38	11,16	3,64 ^a	6,71 ^a
Sem estro	14,57	9,86	0,00 ^b	1,14 ^b

^{a,b} Colunas com diferentes letras sobrescritas diferem pela análise de variância ($p < 0,05$).

Tabela 3

Taxa de prenhez de embriões congelados, descongelados e transferidos pelo método *one-step* de acordo com a classificação morfológica. São Paulo, 1996.

Estágio do Embrião	Classificação (Grau)	Gestações/Embriões Transferidos
Mórula Compacta	I e II	1/25 (4,0%)
Blastocisto inicial	I e II	4/26 (15,4%)
Blastocisto	I e II	2/30 (6,7%)
Total		8/106 (7,5%)

Após a avaliação, os embriões de graus I e II foram colocados em solução de PBS contendo 10% de SFB e 8,4% (1,5 M) de etilenoglicol, onde permaneceram por 10 minutos. A seguir, foram envasados em palhetas de 0,25 ml contendo duas colunas (3,7 cm) de PBS com 10% de SFB nas extremidades e uma coluna central (2,0 cm) com 8,4% de etilenoglicol e o embrião, sendo separadas por duas colunas de ar (1,0 cm). As palhetas foram vedadas com lacradores plásticos e identificadas. Os embriões foram congelados em máquina com temperatura programável (Bio Cool IV), seguindo o seguinte protocolo: imersão em metanol a -6°C , estabilização por 5 minutos, indução da cristalização (*seeding*) na parte superior da coluna do embrião, estabilização por 5 minutos (-6°C), decréscimo da temperatura de congelamento na velocidade de $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto até atingir -30°C , estabilização por 10 minutos, imersão e armazenagem em nitrogênio em estado líquido. As palhetas foram descongeladas durante 10 segundos no ar à temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) e, em seguida, por 20 segundos em água a 37°C , sendo agitadas para misturar as três colunas líquidas e acopladas ao inculador modelo "Hannover" ou "Francês". Foram descongelados 106 embriões (56 de grau I e 50 de grau II), sendo transferidos para a porção cranial do corno uterino ipsilateral ao ovário com o corpo lúteo de receptoras que encontravam-se no dia 6,5 do ciclo estral.

Foram realizados o controle de não-retorno ao estro a partir do 17º dia da transferência dos embriões e o diagnóstico de gestação, pela ultra-sonografia, das receptoras.

Análise estatística

A análise de variância foi realizada pelo procedimento GLM do programa computacional SAS. As variáveis que apresentaram significância estatística ao nível de 5% tiveram suas médias separadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS

Os resultados das superovulações com 300 UI, 400 UI ou 500 UI de FSH/LH, considerando os números de folículos nos dias da inseminação artificial e de corpos lúteos, embriões viáveis e estruturas totais no dia colheita, estão nas Tab. 1 e 2.

Houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as médias de embriões viáveis e de estruturas totais no tratamento com 300 UI (5,20 e 8,10) quando comparadas aos grupos com 400 UI (1,81 e 3,95) e 500 UI (2,76 e 6,29). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as percentagens de animais que apresentaram sintomas de estro após a superovulação nas diferentes doses de FSH/LH, ou seja, 100% para 300 UI de FSH/LH; 85,7% para 400 UI; e 76,2% para 500 UI (Tab. 1). De acordo com estes resultados, avaliaram-se a resposta superovulatória e a recuperação de embriões viáveis e de estruturas totais em animais que apresentaram ou não sintomas de estro após o tratamento superovulatório (Tab. 2).

Os animais que não demonstraram sintomas de estro após o tratamento superovulatório apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), quanto à média de embriões viáveis e de estruturas totais, em relação aos animais que apresentaram sintomas de estro (Tab.2).

Dos 106 embriões grau I e II transferidos, resultaram 8 (7,5%) prenhezes (Tab. 3).

DISCUSSÃO

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. De acordo com Monniaux *et al.*¹⁶, o estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Moor *et al.*¹⁷ relatam a existência de outros componentes da dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais que podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal. Ainda, salientam que apesar das melhorias nas técnicas de transferência de embriões, o problema maior continua sendo a baixa taxa de recuperação de embriões viáveis, podendo ser devido à variação individual frente ao estímulo superovulatório.

A taxa de recuperação de embriões viáveis com 300 UI de FSH/LH foi compatível com a literatura, no entanto, 400 e 500 UI apresentaram baixos resultados (Tab. 1). Zanenga; Silva²⁵ obtiveram média de estruturas e de embriões viáveis de 8,2 e 4,1, respectivamente, para fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

Os animais das raças zebuínas são mais sensíveis aos medicamentos em comparação com os das raças européias. De acordo com Figueiredo *et al.*⁴, os animais da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor concentração de FSH para indução da superovulação. Esta observação condiz com os resultados deste trabalho, pois o grupo com menor dose de FSH (300 UI) apresentou maior número de embriões viáveis e de estruturas totais.

Os animais que não manifestaram sintomas de estro após a aplicação de PGF_2a durante o tratamento superovulatório apresentaram baixo resultado em relação aos números de embriões viáveis e totais (Tab. 2), não se recomendando a colheita de embriões.

A congelamento de embriões bovinos pelo método clássico com glicerol é um processo rotineiro, alcançando índices de prenhez que variam de 30 a 80%^{10,21,26}. A eficiência do método *one-step* para congelamento, descongelamento e transferência de embriões foi confirmada em bovinos *Bos taurus taurus*^{11,13,14,20,21,22}. Entretanto, Jaume; Campos¹¹, utilizando o metanol na congelamento de embriões pelo método *one-step*, não obtiveram prenhez.

Neste trabalho, a congelamento de embriões *Bos taurus indicus* pelo método *one-step*, empregando o etilenoglicol (Tab. 3), resultou em baixo índice de prenhez (7,5%), ao contrário dos resultados de Voelkel; Hu²³ que obtiveram taxa de 50% em vacas Simental (*Bos taurus taurus*), não observando diferença significativa em comparação ao método clássico com glicerol. Lange⁹, utilizando o etilenoglicol no método *one-step*, obteve 58,2% de prenhez, mostrando que este crioprotetor é melhor do que o glicerol no método clássico (48,9%). Voelkel; Hu²⁴, estudando diferentes crioprotetores pelo cultivo *in vitro* de embriões, concluíram que o etilenoglicol apresentou os melhores resultados quando comparado a outros crioprotetores, o que foi confirmado nos experimentos de Suzuki *et al.*²⁰.

As variações encontradas na congelabilidade dos embriões podem estar relacionadas à permeabilidade das células embrionárias e à toxicidade do crioprotetor, pois Esper; Barbosa³, comparando a ultra-estrutura embrionária,

identificaram diferenças entre as células de embriões *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento de novos métodos de criopreservação de embriões *Bos taurus indicus*.

Diante dos baixos índices de prenhez de embriões *Bos taurus indicus* congelados pelo método *one-step* com 1,5 M de etileno glicol, são necessários novos estudos para encontrar o melhor protocolo de congelamento (concentração e tempo de exposição ao etilenoglicol e velocidade de congelamento).

CONCLUSÕES

A dose de 300 UI de FSH/LH apresentou melhor resposta superovulatória em comparação com as de 400 e 500 UI para novilhas da raça Nelore.

A transferência de embriões *Bos taurus indicus* congelados pelo método *one-step* em 1,5 M de etilenoglicol não foi eficiente.

SUMMARY

The objective of this study was to identify the better dose between 300 (n = 20), 400 (n = 21) and 500 IU (n = 21) of FSH/LH to stimulate Nelore heifers. The superovulation treatment started on day 10 (D0 = estrous) of the estrous cycle in 8 decreasing applications for 4 days. The embryo recovery was achieved on day 6.5 after the first artificial insemination. The superovulatory response for 300, 400 and 500 IU FSH/LH was follicles (15.12, 15.76 and 14.94); corpus luteum (10.68, 11.55 and 10.81) and transferable embryos (5.20, 1.81 and 2.76). The 300 IU of FSH/LH group presented the best results in regard to transferable embryos. The transferable embryos were cryopreserved by one-step method with 1.5 M of ethylene-glycol, resulting in 8 pregnancies (7.5%) of 106 embryos transferred by non-surgical method. The 300 IU of FSH/LH presented better superovulatory response in comparison with 400 and 500 IU in Nelore heifers. The transfer of *Bos taurus indicus* embryos cryopreserved by one-step method in 1.5 M of ethylene glycol was not efficient.

UNITERMS: Superovulation; Embryos; Ethylene-glycol; Cattle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.71-86, 1986.
- 2- DEMOUSTIER, J.M.; BECHERS, J.F.; VAUDER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, F. AND ECTORS, F.R. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, v.30, n.2, p.379-86, 1988.
- 3- ESPER, C.R.; BARBOSA, J.C. Ultra-estrutura comparativa de embriões bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. **Anais. Belo Horizonte Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1991. p.295.
- 4- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; ROCHA, G.P.; PAPA, F.O. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.3-4, p.153-235, 1995.
- 5- FOOTE, R.H.; ELLINGTON, J.E. Is a superovulated oocyte normal? **Theriogenology**, v.29, n.1, p.111-23, 1988.
- 6- GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTTEL, P. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.35, n.11, p.408-21, 1983.
- 7- HASLER, J.F.; McCAULEY, A.D.; SCHERMERHORN, E.C.; FOOTE, R.H. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.83-99, 1983.
- 8- JAUME, C.M.; CAMPOS, A.L. Criopreservação de embriões de camundongos e bovinos utilizando metanol como crioprotetor. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.1, p.9-13, 1990.
- 9- LANGE, H. Cryopreservation of bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.258, 1995.
- 10- LEHN-JENSEN, H. **Cryopreservation of bovine embryos: an evaluation of factors influencing the survival of day 6 1/2 - 7 1/2 embryos during freezing and thawing.** Copenhagen, 1986. 184p.
- 11- LEIBO, S.P. A one step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.21, n.5, p.767-90, 1984.
- 12- LINDNER, G.M.; WRIGHT, W.Jr. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v.20, n.4, p.407-16, 1983.

- 13- LOONEY, C.R.; BROEK, D.M.; GUE, C.S.; FUNK, D.J.; FABER, D.C. Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. **Theriogenology**, v.45, n.1, p.170, 1996.
- 14- MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN; ECTORS, F. Cryopreservation de l'embryon bovin: techniques et résultats. **Annales Médecine Vétérinaire**, v.131, n.7, p.515-28, 1987.
- 15- MOLINA, L.R.; SATURNINO, H.M. Avaliação do método *one step* na criopreservação de embriões bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.17, n.3-4, p.89-96, 1993.
- 16- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.55-81, 1983.
- 17- MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limit to superovulation? **Theriogenology**, v.21, n.1, p.103-16, 1984.
- 18- MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W.D. Variability in gonadotrophin preparations as factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.117-25, 1984.
- 19- SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M.; OOE, M.; SAKATA, A.; MATSUOKA, M.; NISHIKATA, Y.; OKAMOTO, K. Effect of sucrose concentration used for one step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glicerol and 1.2-propanediol. **Theriogenology**, v.34, n.6, p.1051-7, 1990.
- 20- SUZUKI, T.; TAKAGI, M.; YAMAMOTO, M.; BOEDIONO, A.; SAHA, S.; SKAKIBARA, 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.651-9, 1993.
- 21- TOTEY, S.M.; SINGH, GURPREET; ANAND, R.K.; SINGHI, GURCHARAN; CHILLAR, R.S.; TALWAR, G.P. Successful pregnancies from cryopreserved crossbred bovine embryos transferred nonsurgically to indigenus low milk-yielding cows. **Indian Journal Animal Science**, v.59, n.5, p.532-6, 1989.
- 22- TOUATI, K.; BORMANS, M.; ECTORS, F.; MASSIP, A. Congélation d'embryons bovins par la méthode au glycerol-sucrose pour transfert direct, apr's décongélation. **Annales Médecine Vétérinaire**, v.134, n.4, p.249-51, 1990.
- 23- VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.23-35, 1992a.
- 24- VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed bovine embryos to recipient females. **Theriogenology**, v.37, n.3, p.687-97, 1992b.
- 25- ZANENGA, C.A.; SILVA, A. Número de embriões viáveis obtidos em relação às superovulações consecutivas em *Bos indicus*. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Universidade Federal de Santa Maria, v.18, suplemento, 32, p.32, 1988.
- 26- ZANENGA, C.A. Congelamento de embriões em zebuínos, evolução e viabilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., Belo Horizonte, 1993. **Anais**. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. p.125-30.

Recebido para publicação: 24/11/1997
Aprovado para publicação: 23/04/1999