

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**SEXAGEM E ACONDICIONAMENTO DE EMBRIÕES EQUINOS
PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN VIVO***

GIOVANA SIQUEIRA CAMARGO

Botucatu, SP
Setembro – 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**SEXAGEM E ACONDICIONAMENTO DE EMBRIÕES EQUINOS
PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN VIVO***

GIOVANA SIQUEIRA CAMARGO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira.
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio.

Botucatu, SP
Setembro – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Camargo, Giovana Siqueira.

Sexagem e acondicionamento de embriões equinos
pré-implantacionais produzidos in vivo / Giovana Siqueira
Camargo. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira

Coorientador: Fernanda Saules Ignácio

Capes: 50504002

1. Embriologia veterinária. 2. Equino. 3. Reação em
cadeia da polimerase. 4. Embriões - Sexagem.

Palavras-chave: Armazenamento; Blastocelo; Colapso
embrionário .

Nome do autor (a): Giovana Siqueira Camargo

Título: Sexagem e acondicionamento de embriões equinos pré-implantacionais produzidos *in vivo*.

Data da defesa: 29 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof^ª. Dr^º. Luiz Daniel de Barros

Membro

Departamento de Clínica Médica Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo

Membro

Departamento de Clínica e Reprodução Animal

Universidade Federal de Jataí - GO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar o meu caminho, minhas decisões e por conceder-me sabedoria, juntamente a Nossa Senhora Aparecida e à Virgem Maria por sempre manterem a minha fé e esperança diante das dificuldades do caminho.

Agradeço meus queridos e saudosos avós Antônio e Aparecida por me passarem essa paixão pelos animais.

Agradeço aos meus pais João Paulo e Rosirene por acreditarem nos meus sonhos, por cada dia de luta e sacrifício, para que pudéssemos alcançar juntos esta conquista, pois sem eles nada seria possível.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a Dr^a Fernanda Saules Ignácio por ser uma inspiração profissional e como ser humano, por cada palavra e lição de vida e por me incentivar, apoiar e confiar, e por todo esforço e dedicação para desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao meu orientador Prof^o Dr Cezinande de Meira pela oportunidade de ingressar na pós-graduação, e por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação, entre outros, por me ajudarem a desenvolverem este projeto.

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, na realização do projeto.

RESUMO

CAMARGO, G. S. **SEXAGEM E ACONDICIONAMENTO DE EMBRIÕES EQUINOS PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN VIVO***. Botucatu – SP. 2022.61p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A sexagem de embriões equinos através do fluido da blastocele (FB), é uma biotecnologia recente, e associada ao transporte de embriões têm boas perspectivas no campo. **Objetivos:**(1) testar a técnica de sexagem por PCR do FB de embriões pré-implantacionais produzidos *in vivo* coletado a partir do colapso embrionário com agulha hipodérmica; (2) avaliar a capacidade de re-expansão embrionária após acondicionamento destes embriões produzidos *in vivo* colapsados; (3) avaliar a qualidade e tamanho de embriões produzidos *in vivo*, colapsados e íntegros, após simulação de transporte sob acondicionamentos em temperatura ambiente (25°C) e refrigeração à 5°C por 24 horas. As condições experimentais visaram mimetizar condições aplicáveis à rotina de campo. **Métodos:** *I* -Foram coletados 42 embriões e distribuídos aleatoriamente entre quatro grupos experimentais: CTA (n=11 embriões colapsados acondicionados em temperatura ambiente), CTR (n=11 embriões colapsados acondicionados sob refrigeração), NCTA (n=10 embriões não colapsados acondicionados em temperatura ambiente) e NCTR (n=10 embriões não colapsados acondicionados sob refrigeração), e todos armazenados por um período de 24 horas. *II* -As amostras de FB (n=19) foram coletadas após o colapso dos embriões com agulha hipodérmica 26G, dos grupos CTA e CTR, e foram submetidas as duas PCR sequenciadas com os primers específicos TSPY e AMEL para a identificação dos sexos. *III* - Apenas três embriões (n=1 CTA, n=1 CTR, e n=1 imediatamente após o colapso) foram submetidos a microscopia por fluorescência com marcador DAPI e microscopia de interferência de contraste (DIC) para uma análise descritiva da lesão. **Resultados:** (I) Todos os embriões submetidos ao colapso sofreram redução no tamanho após as 24h, mas os acondicionados em temperatura ambiente (25°C) apresentaram uma melhor qualidade morfológica após as 24h. Dos embriões íntegros, apenas o grupo NCTA obtiveram uma taxa de crescimento positiva (+25,95%) e mantiveram sua qualidade de grau 1 excelente em M24, enquanto que os refrigerados a 5°C apresentou uma queda na classificação com 20% de embriões degenerados após as 24h. (II) A técnica de sexagem por FB mostrou-se eficiente com o diagnóstico de 57,90% de machos, através da amplificação de bandas específicas para TSPY com as duas PCR sequenciadas. (III) A lesão embrionária causada pelo colapso manual com a agulha hipodérmica 26G foi visualizada por microscopia de fluorescência. É possível realizar a sexagem embriões equinos através de amostras do FB por PCR. **Conclusões:** Os embriões colapsados com a agulha hipodérmica 26G são capazes de se recuperar parcialmente das lesões, principalmente quando acondicionados em meio de manutenção em temperatura ambiente por até 24h. A temperatura ambiente (25°C) demonstrou ser a melhor temperatura de acondicionamento para o transporte de embriões equinos íntegros e colapsados por até 24h, dentro das condições apresentadas, por atuar diretamente otimizando a qualidade morfológica durante as 24hrs. Estudos complementares são necessários para comprovar a viabilidade das células embrionárias pós-colapso como teste *in vitro*, e a aplicabilidade de inovulação desses embriões para obtenção de suas possíveis taxas de prenhez e perdas embrionárias como teste *in vivo*.

Palavras-chave: colapso embrionário, blastocele, armazenamento, transporte, PCR.

ABSTRACT

CAMARGO, G. S. **SEXING AND PACKAGING OF PREIMPLANTATIONAL EQUINE EMBRYOS PRODUCED *IN VIVO***. Botucatu– SP. 2022. 61p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The sexing of equine embryos through the blastocoel fluid (BF) is a recent biotechnology, and associated with embryo transport has good prospects in the field. Objectives:(1) to test the technique of PCR sexing the FB of pre-implantation embryos produced *in vivo* collected from embryonic collapse with a hypodermic needle; (2) to evaluate the capacity of embryonic re-expansion after packaging these collapsed *in vivo* produced embryos; (3) to evaluate the quality and size of embryos produced *in vivo*, collapsed and intact, after simulation of transport under packaging at room temperature (25°C) and refrigeration at 5°C for 24 hours. The experimental conditions aimed to mimic conditions applicable to the field routine. Methods: I - Forty-two embryos were collected and randomly distributed among four experimental groups: CTA (n=11 collapsed embryos conditioned at room temperature), CTR (n=11 collapsed embryos conditioned under refrigeration), NCTA (n=10 non-collapsed embryos conditioned at room temperature) and NCTR (n=10 non-collapsed embryos stored under refrigeration), and all stored for a period of 24 hours. II - The FB samples (n=19) were collected after the embryos collapsed with a 26G hypodermic needle, from the CTA and CTR groups, and were submitted to two PCR sequenced with the specific primers TSPY and AMEL to identify the sexes. III - Only three embryos (n=1 CTA, n=1 CTR, and n=1 immediately after collapse) were submitted to fluorescence microscopy with DAPI marker and contrast interference microscopy (DIC) for a descriptive analysis of the lesion. Results: (I) All embryos submitted to collapse suffered a reduction in size after 24h, but those conditioned at room temperature (25°C) showed a better morphological quality after 24h. Of the intact embryos, only the NCTA group achieved a positive growth rate (+25.95%) and maintained their excellent grade 1 quality in M24, while those refrigerated at 5°C showed a decrease in classification with 20% of embryos degenerated after at 24h. (II) The FB sexing technique proved to be efficient with the diagnosis of 57.90% of males, through the amplification of specific bands for TSPY with the two sequenced PCRs. (III) The embryonic lesion caused by manual collapse with the 26G hypodermic needle was visualized by fluorescence microscopy. It is possible to sex equine embryos using FB samples by PCR. Conclusions: Embryos collapsed with the 26G hypodermic needle are able to partially recover from the lesions, especially when placed in a maintenance medium at room temperature for up to 24 hours. Room temperature (25°C) proved to be the best packaging temperature for the transport of intact and collapsed equine embryos for up to 24 hours, under the conditions presented, by acting directly optimizing the morphological quality during the 24 hours. Complementary studies are needed to prove the viability of post-collapse embryonic cells as an *in vitro* test, and the applicability of inovation of these embryos to obtain their possible pregnancy and embryo loss rates as an *in vivo* test.

Keywords: embryonic collapse, blastocoel, storage, transport, PCR.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Sexagem de embriões pré-implantacionais	10
2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) na sexagem de embriões	13
2.3. Transporte do embrião	14
2.4. Avaliação da morfologia embrionária	17
2.5. Avaliação da viabilidade embrionária	17
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	18
3.1. Hipótese(s)	18
3.2. Objetivo(s)	19
3.2.1 Objetivos Gerais	19
3.2.2 Objetivos Específicos	19
4. REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2	27
ARTIGO CIENTÍFICO	28
Resumo	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. METODOLOGIA	31
2.1. Aspectos éticos	31
2.2. Animais e grupos experimentais	31
2.3. Preparação das doadoras	32
2.4. Manipulação e colapso	32
2.5. Avaliação morfológica dos embriões	33
2.6. Simulação de transporte e Acondicionamento do embrião	34
2.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
2.8. Microscopia de fluorescência e microscopia de contraste de interferência (DIC)	36
2.9. Análise estatística	37
3. RESULTADOS	38
3.1. Simulação de transporte e acondicionamento dos embriões.	38
3.2. Sexagem embrionária	48

3.3. Análises descritivas por microscopia de fluorescência e microscopia de contraste de interferência (DIC).....	48
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÃO	57
AGRADECIMENTOS	57
REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Há anos o Brasil está entre os maiores produtores de embriões equinos no mundo. No ano de 2020 houve um aumento na indústria de embriões no mundo, e o Brasil liderou a coleta de embriões equinos produzidos *in vivo* com 87,7% da produção mundial (IETS, 2021). Esses dados só enfatizam o quanto a transferência de embriões (TE) é uma tecnologia comercial amplamente realizada a campo e com um reflexo direto na economia equina, e que em associação com outras biotecnologias potencializa o uso dos embriões e a comercialização dos animais, por permitir o direcionamento do nascimento de produtos de maior valor comercial (SQUIRES *et al.*, 1999; SQUIRES, 2020).

O transporte e a sexagem de embriões pré-implantacionais são importantes exemplos dessas biotécnicas. O primeiro por permitir o uso de doadoras e receptoras que não estão localizadas na mesma propriedade, facilitando a comercialização de “ventres” e aluguéis de receptoras (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2015). O segundo por permitir a identificação do sexo do potro que nascerá, adequando assim a produção de embriões à predileção do mercado (HERRERA *et al.*, 2014).

A grande cadeia do mercado equestre que envolve os programas de TE com a produção *in vivo* (MOUSSA *et al.*, 2006; MOYA-ARAUJO *et al.*, 2010) e *in vitro* (HINRICHS; CHOI, 2012), gerou a necessidade de transporte dos embriões por períodos curtos, de aproximadamente um dia. O transporte viabiliza a realização da TE independentemente do local onde as doadoras e receptoras estejam alojadas (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2015). Porém, apesar de seu grande uso e grande importância dentro dos programas de TE, poucos são os trabalhos recentes que avaliam as condições disponíveis a campo de temperatura adequada para que os embriões sejam transportados com segurança e que comprovadamente garantam o mínimo de lesões celulares possível (CLARK *et al.*, 1987; COOK *et al.*, 1989; CARNEY *et al.*, 1991; CARNEVALE *et al.*, 2000; MOUSSA *et al.*, 2006; CUERVO-ARANGO *et al.*, 2018; SQUIRES, 2020).

Estudos com a sexagem e com o diagnóstico genético pré-implantacional (*Preimplantation Genetics Diagnosys* - PGD) por meio da biopsia de embriões equinos foram iniciados há alguns anos (HUHTINEN *et al.*, 1997a; CHOI *et al.*, 2010; HINRICHS; CHOI, 2012; HERRERA *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2015; RIERA *et al.*, 2019). Em circunstância de que, em algumas raças existe a predileção por animais machos ou fêmeas, e a identificação do sexo previamente gera produtos mais comercializáveis e de maior valor

(HERRERA *et al.*, 2014). Porém, apesar do grande interesse pelo serviço, a técnica não é rotineiramente aplicada no campo devido ao alto custo de sua implantação (SCOTT *et al.*, 2013), além da dificuldade de se obter um grande número de embriões para desenvolvimento de pesquisas (HERRERA *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2015; HERRERA *et al.*, 2018).

Entretanto, com a evolução dos estudos sobre PGD em embriões humanos produzidos *in vitro*, em 2013 relatou-se pela primeira vez a presença de DNA genômico livre no fluido da blastocele (FB) (PALINI *et al.*, 2013). E nos anos seguintes, também foi comprovado a presença de DNA livre no FB de embriões equinos pré-implantacionais, em quantidades suficientes para realização da sexagem (HERRERA *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2015; HERRERA *et al.*, 2018).

Logo, a associação dessas descobertas à outras pesquisas com o colapso embrionário (CHOI *et al.*, 2011; FERRIS *et al.*, 2016), despertou o interesse no desenvolvimento de uma técnica mais simples e menos custosa que poderia viabilizar a realização da sexagem de embriões pré-implantacionais de maneira rotineira à campo (ANDRADE *et al.*, 2017).

Em sequência, um estudo apresentou resultados com a técnica de perfuração embrionária com agulha hipodérmica 26G para coleta do FB, seguido da sexagem dessa amostra, no qual se mostrou possível uma vez que o sexo foi determinado em 55,6% (5/9) das amostras de FB (ANDRADE *et al.*, 2017). Entretanto os mesmos autores destacaram as dificuldades de amplificação do material genético para realização do PCR convencional e as chances de falsos negativos em caso de não detecção do sexo feminino nas amostras, o que demonstra que mais estudos devem ser realizados para aumentar a confiabilidade da técnica.

Em suma, o presente estudo preconiza as condições disponíveis com a realidade da rotina, quanto ao transporte de embriões e com a viabilização da aplicação de técnicas de sexagem embrionária para adequação dessas biotecnologias aplicáveis no campo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sexagem de embriões pré-implantacionais

Por um longo período, de 1989 a 2005, a maior dificuldade frequentemente relatada na sexagem de embriões pré-implantacionais era a realização da coleta de material genético de embriões equinos sem que houvesse lesão da cápsula embrionária, já que era comum a afirmação de que a gestação não poderia se estabelecer se houvesse qualquer dano capsular (SKIDMORE *et al.*, 1989; STOUT *et al.*, 2005). Logo, um estudo em 2010 realizou a biópsia

embrionária usando o Piezo Drill, uma espécie de broca acoplada ao micromanipulador que permitiu a obtenção de uma taxa de prenhez de 100% (3/3) (CHOI *et al.*, 2010).

Apesar da cápsula ter importância fundamental no estabelecimento da gestação e as lesões sobre a mesma serem sugestivas de um efeito negativo neste processo, os embriões demonstram capacidade de recuperação após uma lesão total ou parcial com o micromanipulador (CHOI *et al.*, 2010). A partir de então, os autores puderam demonstrar que a lesão capsular não era um impedimento para estabelecer a gestação e a biópsia embrionária passou a ser utilizada para o PGD (CHOI *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2011; HERRERA *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2016; RIERA *et al.*, 2019).

O PGD por meio da biópsia de blastômeros está na reprodução humana há 30 anos (HANDYSIDE *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 2018) para determinar o status genético de embriões em risco e a identificação do sexo (OGILVIE *et al.*, 2005). Nos animais domésticos, como bovinos (KIRKPATRICK; MONSON, 1993; HASLER *et al.*, 2002), equinos (HUHTINEN *et al.*, 1997a) e caprinos (EL-GAYAR; HOLTZ, 2005), a técnica também já permitiu a identificação de características genéticas específicas dos embriões com uma boa perspectiva de aplicabilidade (HERRERA *et al.*, 2016).

No primeiro relato de biópsia embrionária em equinos foram biopsados 14 embriões para sexagem genética utilizando um micromanipulador e uma microlâmina, mas os autores obtiveram uma taxa de concepção de 21,4% (3/14) (HUHTINEN *et al.*, 1997a). As diferentes metodologias aplicadas em estudos posteriores resultaram em taxas de prenhez variadas, por exemplo, em um deles as taxas de concepção de embriões precoces (6 e 7 dias de desenvolvimento) biopsados se apresentaram boas inicialmente, com 75% no 15º dia de gestação, mas com perdas subsequentes reduziram para 38% as taxas de prenhez no 45º dia de gestação (TROEDSSON *et al.*, 2010). Em outro, o critério estudado foi a correlação do tamanho embrionário com a taxa de prenhez, e a transferência de embriões biopsados apresentaram taxas de 21% à 75%, porém essa taxa foi inferior (29%) em embriões de menores diâmetros (SEIDEL *et al.*, 2010).

Os resultados na identificação do sexo de embriões biopsados através da PCR sofrem interferência com o estágio de desenvolvimento, sendo aqueles embriões em estágio de blastocisto expandido melhores para o diagnóstico do que os alcançados com blastocisto e blastocisto inicial, um resultado aparentemente esperado devido ao maior número de células dos embriões maiores (RIERA *et al.*, 2019). Porém, a técnica de biópsia em embriões em fase de blastocisto expandido (Bx), pode ser dificultada pela presença da cápsula e de conexões celulares que aumentam a resistência à retirada das células (SCOTT *et al.*, 2013).

Além disso, há alguns relatos sobre a influência negativa das biópsias embrionárias no desenvolvimento neurológico, epigenético e adrenal de embriões humanos (MIDDELBURG *et al.*, 2010), levando às funções anormais dos neurônios em embriões de camundongos com 4,5 e 7,5 dias de desenvolvimento (WU *et al.*, 2014) e anomalias epigenéticas no tecido cerebral em murinos (ZHAO *et al.*, 2013).

Entretanto, o cenário da PGD mudou com os estudos sobre a presença de DNA livre no FB de embriões humanos produzidos *in vitro* em quantidades suficientes para amplificação e realização da PCR (PALINI *et al.*, 2013). A hipótese é que o DNA livre seja oriundo dos mecanismos de liberação de material genético na cavidade da blástula consequentes dos processos apoptóticos e necróticos que ocorrem durante as clivagens e desenvolvimento embrionário inicial (HARDY *et al.*, 1989; PALINI *et al.*, 2013). Os processos apoptóticos são utilizados como mecanismo de eliminação de fragmentos e células com defeitos genéticos (HARDY *et al.*, 1989).

Previamente no desenvolvimento embrionário inicial, ocorre as diferenciações celulares. A primeira delas acontece entre as fases de mórula e blastocisto durante as quais são formados o trofoblasto e a massa celular interna (MCI) (VANDERWALL *et al.*, 1996). No estágio de mórula, os blastômeros produzem substâncias proteicas que se concentram entre eles, este acúmulo proteico promove hiperosmolaridade e carrega água do meio extracelular entre os blastômeros em resposta a um equilíbrio eletrolítico, iniciando assim a formação do FB (VANDERLEY; SANTANA, 2015).

Pesquisas com embriões equinos produzidos *in vivo* e *in vitro* também detectaram a presença de DNA livre no FB em quantidades suficientes para a realização da amplificação por PCR e identificação do sexo dos embriões (HERRERA *et al.*, 2015). Interessante salientar que os resultados de sexagem obtidos pela PCR de amostras do FB e de amostras de células biopsadas foram compatíveis (HERRERA *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2015; HERRERA *et al.*, 2018).

Um estudo trouxe novas perspectivas, com a realização do colapso de embriões equinos utilizando uma agulha hipodérmica 26 G com o propósito de reduzir o diâmetro e a quantidade de líquido para otimizar o processo de vitrificação de blastocistos expandidos grandes (>500µm) produzidos *in vivo*. Mesmo após a lesão na cápsula, o colapso embrionário e o processo da criopreservação por vitrificação os embriões ainda apresentaram uma taxa de prenhez de 46,7% (7/15) (FERRIS *et al.*, 2016). No mesmo ano de 2016, outros autores utilizaram uma micropipeta de vidro para a punção e obtiveram uma taxa de sobrevivência de 96% (24/25) dos embriões (GUIGNOT *et al.*, 2016).

Ainda sobre a punção manual, outro estudo demonstrou que a técnica de colapso manual com agulha hipodérmica de 26G (13x0,45mm) (ANDRADE *et al.*, 2017) seguida de acondicionamento à temperatura ambiente não controlada em caixa isotérmica por 24h permitiu a re-expansão da blastocèle, observada por avaliação morfológica em estereomicroscópio (ANDRADE *et al.*, 2018). Os embriões apresentavam inicialmente tamanho entre 400 e 2600 μ m e todos foram classificados como grau 1 (excelente) [gradação de 1-5 de qualidade embrionária (MCKINNON e SQUIRES, 1988a)]. Após acondicionamento, 17,6% (3/17) foram classificados como grau 2 (bom), 47% (8/17) como grau 3 (regular), 29,4% (5/17) como grau 4 (pobre) e 0,06% (1/17) grau 5 (não houve recuperação) (ANDRADE *et al.*, 2018).

Na sequência, estudos demonstram que a taxa de prenhez de embriões perfurados com micromanipulador e manualmente por agulha de acupuntura e micro-agulha de tungstênio foi de 75% (15/20), 0% (0/10) e 67% (10/15), respectivamente, sendo que, estes embriões não foram submetidos à vitrificação. O teste foi importante para demonstrar a capacidade dos embriões de gerarem uma gestação imediatamente após a punção (máximo de 30min em meio até a inovulação) (WILSHER *et al.*, 2018).

Apesar dos resultados promissores em 2018, os mesmos autores vitrificaram os embriões imediatamente após a punção manual com micro-agulha e encontraram taxas de prenhez de 82% (14/17) para embriões entre 330-560 μ m, mas de apenas 5% (1/20) para embriões acima de 560 μ m, ou seja, o tamanho dos embriões blastocistos expandidos produzidos *in vivo* foi importante para a determinação das gestações após a punção manual seguida da vitrificação/desvitrificação (WILSHER *et al.*, 2020).

Com isso, a associação dos dois conhecimentos, a presença de DNA livre no FB suficiente para a determinação do sexo e a capacidade de embriões equinos de resistirem ao colapso com agulha hipodérmica, foi a base para o delineamento experimental de um estudo que permitiu a identificação do sexo em 55,6% (5/9) embriões equinos produzidos *in vivo* submetidos ao colapso com agulha hipodérmica seguido da PCR do FB extravasado (ANDRADE *et al.*, 2017).

2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) na sexagem de embriões

Estudos sobre identificação de sexo e amplificação de genes de embriões equinos por meio da PCR convencional estão presentes na literatura desde os anos 90, e diferentes tipos de reações, de oligonucleotídeos indicadores (primers) e de termociclagens já foram

estudadas (NAKAHORI *et al.*, 1991; PEIPPO *et al.*, 1995; FUKUSHIMA *et al.*, 1999; HASEGAWA *et al.*, 2000). Porém dentre os estudos de referência, para amostras de células embrionárias e de FB, os parâmetros de termociclagem utilizados foram: 95° C por 1 minuto, 35 ciclos de 94° C por 15 segundos, 58,4° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos e 72° C por 5 minutos (HERRERA *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2015). E os produtos finais amplificados são submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para identificação das bandas específicas (HERRERA *et al.*, 2014).

Os primers mais comumente utilizados para amplificar os genes do sexo equino em amostras de células embrionárias ou de FB são: *SRY*, um gene determinante para cromossomo Y, com 429 pares de bases (pb) (HASEGAWA *et al.*, 2000; HERRERA *et al.*, 2014); o *TSPY*, um gene do cromossomo Y presente na proteína específica do testículo, com 280 pb (PARIA *et al.*, 2011; HERRERA *et al.*, 2015); e *Amelogenina* (AMEL) (HERRERA *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2015), que é uma matriz extracelular envolvida na construção do esmalte dentário e está localizada nos cromossomos sexuais X e Y (NAKAHORI *et al.*, 1991). A região codificadora deste gene no cromossomo Y (AMELY) é mais curta do que no cromossomo X (AMELX) com 184 pb em uma banda única para fêmea e 160 a 200 pb em uma banda dupla para macho (FUKUSHIMA *et al.*, 1999; HASEGAWA *et al.*, 2000).

Devido a menor quantidade e a possível fragmentação do DNA presente nas amostras de FB, alguns estudos conciliaram à técnica de PCR convencional com outros métodos para maior amplificação do DNA, como PCR Duplex (HERRERA *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2015), *Nested* PCR (HERRERA *et al.*, 2014) ou PCR em tempo real que é mais utilizados em embriões humanos (PALINI *et al.*, 2013).

2.3. Transporte do embrião

Rotineiramente utilizado em programas de TE na espécie equina, o transporte de embriões viabiliza o uso de bancos de receptoras em centros especializados para onde eles podem ser enviados e inovulados em éguas previamente preparadas (SQUIRES, 2020). Porém, poucos estudos recentes avaliaram a melhor forma de realização deste procedimento, considerando as condições e métodos mais utilizados ultimamente a campo: meio de manutenção, temperatura de transporte (refrigerado ou temperatura ambiente) e caixa de transporte (CLARK *et al.*, 1987; COOK *et al.*, 1989; CARNEY *et al.*, 1991; CARNEVALE *et al.*, 2000; MOUSSA *et al.*, 2006; CUERVO-ARANGO *et al.*, 2018; SQUIRES, 2020).

Por muito tempo estudos utilizaram o meio de manutenção (ou meio holding) Ham's F-10® para transporte dos embriões (CLARK *et al.*, 1987; CARNEVALE *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2002; MOUSSA *et al.*, 2004), no entanto, este meio exige manutenção

correta do pH em presença de CO₂ (5%), O₂ (5%) e N₂ (90%) para manter a estabilidade tamponante por bicarbonato, o que dificulta sua aplicabilidade no campo (GOOD *et al.*, 1966; MOUSSA *et al.*, 2003).

Uma alternativa foi o uso de meios com um sistema de tamponamento não dependente de CO₂ e com a pK adequada entre 6 e 8. Esses tampões pertencem ao mesmo grupo, são os tamponantes o hepes e os zwitteriônicos (GOOD *et al.*, 1966; MOUSSA *et al.*, 2003). Estes são a base de uma molécula neutra e um íon tampão metabolicamente inerte que não atravessa as membranas celulares, proporcionando assim um microambiente estável na zona pelúcida (zp) que não inibe o desenvolvimento embrionário como acontece com o tampão de fosfato (GOOD *et al.*, 1966; SESHAGIRI; BAVISTER, 1991).

Seguindo a linha dos meios tamponantes zwitteriônicos e suas taxas de prenhez, um estudo obteve uma taxa de 80% de prenhez com embriões equinos mantidos em meio Embriocare® por 70 minutos em temperatura ambiente (23°C a 35°C) até a inovulação (CAIADO *et al.*, 2009). Outras soluções “holding” de embriões, como o Emcare® (EHS) e o ViGro® holding plus (VHP), também demonstraram ser uma boa alternativa para o meio Ham’s F-10® no transporte de embriões equinos (MOUSSA *et al.*, 2002). E as últimas taxas a serem relatadas com tampões que não dependem de atmosfera controlada, foram com o meio BotuEmbryo® e o meio TQC Holding Plus®, que alcançaram taxas de prenhez de 83% (30/36) e 75% (33/44), respectivamente, e foram eficientes em manter os embriões em temperatura ambiente pelos 120 minutos avaliados (GOMES *et al.*, 2014).

A temperatura é um importante fator a ser avaliado, pois reflete na qualidade do embrião e posteriormente na prenhez (CLARK *et al.*, 1987; CARNEVALE *et al.*, 1987). Nos anos 80, os estudos iniciais utilizaram metodologias similares, cultivaram embriões em meio PBS (“Phosphate Buffered Saline”) acrescido de soro fetal bovino à 37°C por 3h e até 24h (IMEL *et al.*, 1981; SQUIRES *et al.*, 1982). Em ambos os estudos, os embriões foram transferidos pelo método cirúrgico, e as taxas de prenhez foram de 21,3% (3/14) quando mantidos por até 3h e 6,6% (1/15) quando mantidos por 24h (IMEL *et al.*, 1981), enquanto que no estudo subsequente, as taxas obtidas foram de 47,1% (8/17) e 20% (3/15), respectivamente (SQUIRES *et al.*, 1982). Como consequência desses primeiros resultados, o transporte de embriões passou a ser realizado por períodos curtos, de até 3h após a colheita, e em temperatura ambiente (IMEL *et al.*, 1981; SQUIRES *et al.*, 1982).

Entretanto, alguns anos depois, um estudo apresentou taxas de prenhez similares entre os embriões armazenados por 12h à 24°C (8/16) e os inovulados 1h após a coleta (7/16), na avaliação do transporte de embriões em meio Ham’s F-10® por até 12h à 24°C,

demonstrou que a viabilidade embrionária se manteve nestas condições (CLARK *et al.*, 1987).

Ainda considerando a avaliação morfológica, embriões acondicionados por 12 ou 24h à 5°C ou 24°C em meio Ham's F-10® ou meio MEM (meio essencial mínimo com Sais de Hank) (EARLE®), demonstraram que aqueles mantidos em meio Ham's F-10® à 24°C apresentaram uma qualidade melhor do que os embriões mantidos no meio MEM à 5°C por 24h, e que houve degradação da qualidade embrionária de 12 para 24h de acondicionamento quando os embriões foram mantidos em meio MEM independente da temperatura (CLARK *et al.*, 1985).

Contudo, a refrigeração se fez presente nas pesquisas, principalmente por atuar na desaceleração do metabolismo embrionário e conseqüentemente à latência dos estágios de desenvolvimento e à manutenção do tamanho durante o armazenamento (MCCUE *et al.*, 2011; RIERA *et al.*, 2019). Com isso, os estudos foram sendo direcionados para avaliação da refrigeração dos embriões nos transportes mais longos de até 24h (CARNEVALE *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2002; MOUSSA *et al.*, 2003; MOUSSA *et al.*, 2004).

Inicialmente, as taxas de prenhez desse tipo de transporte não diferiram entre os embriões transferidos após refrigeração à 5°C e transferidos a fresco. Estudos demonstram taxas de prenhez similares entre embriões frescos transferidos até 1h após colheita (90%) e embriões refrigerados à 5°C (70%) por 24h em meio Ham's-F10 e atmosfera controlada (CARNEVALE *et al.*, 1987). Já em um estudo seguinte, resultados opostos foram observados, sendo que as taxas de prenhez foram menores para os embriões refrigerados que para os embriões frescos (COOK *et al.*, 1989).

Em um outro estudo, utilizando o mesmo meio e condições de armazenagem, observaram que, embora a taxa de prenhez não tenha diferido entre embriões frescos (1h da colheita) e embriões refrigerados, houve maior perda das gestações entre 12 e 35 dias dos embriões refrigerados por 12h (CARNEY *et al.*, 1991). Em outro relato, alguns embriões deterioraram sob a refrigeração (CLARK *et al.*, 1987), o que parece ter um efeito negativo sobre a qualidade morfológica danificando principalmente a massa celular interna (MCI), mas também as células do trofoblasto (CARNEVALE *et al.*, 1987).

Quando o tamanho dos embriões é considerado, embriões pequenos (<175 µm) armazenados sob refrigeração se mostraram mais suscetíveis a sofrerem danos do que embriões grandes (CLARK *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2004). Além disso, existem relatos de que embriões refrigerados resultam em uma menor vesícula embrionária (CARNEVALE

et al., 2000) como consequência do retardo no metabolismo e desenvolvimento (MCCUE *et al.*, 2011).

Por fim, é interessante salientar que, a partir do desenvolvimento da técnica de transferência de embriões equinos não cirúrgica (MEIRA e HENRY, 1991), as taxas de prenhez pós TE se consolidaram e, entre os fatores que afetam a taxa de prenhez e perda embrionária precoce, a refrigeração dos embriões por mais de 12h é citada como responsável pela perda de 25% das gestações ente 15 e 50 dias de gestação (CARNEVALE *et al.*, 2000).

2.4. Avaliação da morfologia embrionária

A avaliação morfológica foi implantada há anos nos programas de TE com o objetivo de avaliar a qualidade embrionária antes da transferência, validar diferentes tipos de transportes, meios de cultivo e manipulações embrionárias (CLARK *et al.*, 1985; CLARK *et al.*, 1987; CARNEVALE *et al.*, 2000; MOUSSA *et al.*, 2003; MOUSSA *et al.*, 2004). Mesmo sendo uma avaliação subjetiva, a utilização de um método consistente, como o descrito em 1988 (MCKINNON, SQUIRES, 1988a), tem um valor preditivo sobre a taxa de prenhez e sobre a perda de embriões pré-transferência (VANDERWALL *et al.*, 1996; CARNEVALE *et al.*, 2000; MCCUE *et al.*, 2009).

Assim, é um critério de que tem grande aplicação comercial, por fornecer informações sobre a probabilidade de efetivar prenhez após a transferência, e nas pesquisas, por fornecer informações sobre os efeitos das novas técnicas ou produtos sobre a viabilidade do embrião, pois para ambos é desejável que se tenha um método de avaliação da qualidade antes e depois de um procedimento (VANDERWALL *et al.*, 1996).

O sistema de classificação morfológica para embriões equinos atribuiu aos embriões uma pontuação de qualidade em graus de 1 a 5, sendo 1- excelente, 2- bom, 3- razoável, 4- pobre, 5- não fecundado ou morto. As características morfológicas analisadas para essa classificação são: compactação de blastômeros, blastômeros extrusados e/ou envelhecidos, coloração das células, formato do embrião, espaço perivitelino, dano a zp e cápsula, e a relação entre estágio de desenvolvimento e a idade do embrião (MCKINNON, SQUIRES, 1988a). As principais anormalidades morfológicas encontradas em embriões produzidos *in vivo* foram o encolhimento do trofoblasto e da zp, blastocistos (BI) escuros e irregulares, blastômeros extrusados e MCI escura (MCKINNON; SQUIRES, 1988b).

2.5. Avaliação da viabilidade embrionária

Nas pesquisas com embriões, principalmente os com as biotecnologias avançadas dos embriões humanos produzidos *in vitro*, existem diversos métodos de avaliações de

viabilidade e do desenvolvimento embrionário, porém nenhum considerado padrão ouro (RUBESSA; WHELLER, 2020). A aplicabilidade de cada técnica varia com a pesquisa e a experiência de cada embriologista (STORR *et al.*, 2017).

Dentre as avaliações feitas por microscopia, a microscopia de contraste de interferência (DIC), conhecida principalmente por avaliações de células espermáticas (WHITESELL *et al.*, 2020), é uma técnica utilizada para o estudo de células vivas e pode ser aplicada para embriões (ZIV; SCHILLER, 2007). A microscopia por fluorescência associada ao microscópio confocal (ZUCKER, ROGER, 2019) é um método que apresenta vantagens para análise da viabilidade (VANDORMAEL-POURNIN *et al.*, 2021).

Os marcadores de fluorescência tornam possíveis as análises de características celulares (RUBESSA; WHELLER, 2020), exemplos desses marcadores são: o 4',6'-diaminophenylindole (DAPI) para contagens de núcleos apoptóticos (SCHILLING *et al.*, 1979; SANDALL *et al.*, 2018), o TUNEL para avaliação da taxa apoptótica (CANESIN *et al.*, 2020) permitindo também a análise de fragmentação do DNA nuclear (BRISON; SCHLTZ, 1997; BRISON; SCHLTZ, 1998), a anexina V também como marcador de apoptose em vários tipos celulares (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007), o iodeto de propídeo para avaliar a porcentagem de células vivas (OBERSTEIN *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2020) e entre outros descritos na literatura.

Um teste de viabilidade aplicável ao campo é interessante para complementar a avaliação morfológica na rotina dos programas de TE e o marcador DAPI já foi utilizado com essa proposta (HUHTINEN *et al.*, 1997b; TREMOLEDA *et al.*, 2003; MOUSSA *et al.*, 2004; THARASANIT *et al.*, 2005; PEREZ-MARIN *et al.*, 2018). Por ser uma substância que não penetra as membranas celulares, cora apenas a cromatina de células danificadas e por isso tem sido usado para avaliação de viabilidade de membrana de embriões criopreservados (HUHTINEN *et al.*, 1997b; THARASANIT *et al.*, 2005; PEREZ-MARIN *et al.*, 2018).

Em alguns estudos, após aplicação do corante DAPI nos embriões produzidos *in vivo* (HUHTINEN *et al.*, 1995; HUHTINEN *et al.*, 1997b; MOUSSA *et al.*, 2006;) e *in vitro* (CANESIN *et al.*, 2020), e não influenciou na sobrevivência do embrião pós-transferência (HUHTINEN *et al.*, 1995; HUHTINEN *et al.*, 1997b; MOUSSA *et al.*, 2006; CANESIN *et al.*, 2020).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese(s)

- A coleta do FB pelo extravasamento após colapso com agulha hipodérmica 26G de embriões em uma microgota permite a recuperação de uma amostra contendo quantidades suficientes de DNA livre para a realização do diagnóstico do sexo do embrião pela técnica de PCR.

- A manutenção do embrião em meio apropriado disponível para uso a campo em temperatura ambiente e acondicionado em caixa isotérmica (evitar oscilações) para o transporte do embrião por até 24h são mais adequadas que em condições de refrigeração a 5°C por pelo mesmo período por manter a atividade do embrião e qualidade.

- Embriões em estágio de Bx produzidos *in vivo* são capazes de se recuperar em condições de simulação de transporte após a lesão causada pelo colapso com agulha hipodérmica e a recuperação é melhor quando em temperatura ambiente.

3.2. Objetivo(s)

3.2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo tem como objetivo avaliar as condições compatíveis com a realidade do campo quanto ao transporte de embriões se com a viabilização da aplicação de técnicas de sexagem embrionária para o campo.

3.2.2 Objetivos Específicos

Testar a técnica de sexagem por PCR do FB de embriões pré-implantacionais produzidos *in vivo* coletado a partir do colapso embrionário com agulha hipodérmica; Avaliar a capacidade de re-expansão embrionária após acondicionamento destes embriões produzidos *in vivo* colapsados; Avaliar a qualidade e tamanho de embriões produzidos *in vivo*, colapsados e íntegros, após simulação de transporte sob acondicionamentos em temperatura ambiente e refrigeração à 5°C por 24 horas.

4. REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. R. F.; BARROS, L. D.; IGNÁCIO, F. S. Sexagem embrionária *in vivo* em equinos por microaspiração do líquido da blastocela seguida por reação da cadeia em polimerase (PCR). **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 2017.

ANDRADE, E. R. F.; GARCIA, L. V.; AMATTI, L. Z.; BARROS, L. D.; IGNÁCIO, F. S. Avaliação da recuperação de embriões equinos após colapso com agulha hipodérmica. **XIX Conferência Anual Abraveq**, pág.94, 2018.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor α . **Biology of reproduction**, v. 56, n. 5, p. 1088-1096, 1997.

- BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor α -deficient mouse blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 1, p. 136-144, 1998.
- CAIADO, J. R. C.; VAN TILBURG, M. F.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; BARRETO, M. A. P. Comparação entre dois meios para transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 938-946, 2009.
- CANESIN, H. S.; ORTIZ, I.; ROCHA FILHO, A. N.; SALGADO, R. M.; BROM-DE-LUNA, J. G.; HINRICHS, K. Effect of warming method on embryo quality in a simplified equine embryo vitrification system. **Theriogenology**, v. 151, p. 151-158, 2020.
- CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-79, 2000.
- CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O. Comparison of Ham's F10 with CO₂ or HEPES buffer for storage of equine embryos at 5 C for 24 H. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 6, p. 1775-1781, 1987.
- CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; SEIDEL JR, G. E.; JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 23-32, 1991.
- CHEN, H. F., CHEN, S. U., MA, G. C., HSIEH, S. T., TSAI, H. D., YANG, Y. S., CHEN, M. Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future challenges. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 2, p. 94-100, 2018.
- CHOI, Y. H.; GUSTAFSON-SEABURY, A.; VELEZ, I. C.; HARTMAN, D. L.; BLISS, S.; RIERA, F. L.; ROLDÁN, J. E.; CHOWDHRY, B.; HINRICHS, K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for pre-implantation genetic diagnosis. **Animal Reproduction Science**, v.140, n. 6, p. 893-902, 2010.
- CHOI, Y. H.; PENEDO, M. C. T.; DAFTARI, P.; VELEZ, I. C.; HINRICHS, K. Accuracy of preimplantation genetic diagnosis in equine in vivo-recovered and in vitro-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 9, p. 1382-1389, 2015.
- CHOI, Y.H; HINRICHS, K. Vitrification of in vitro-produced and in vivo-recovered equine blastocysts in a clinical program. **Theriogenology**, v. 87, p. 48-54, 2016.
- CHOI, Y. H.; VELEZ, I. C.; RIERA, F. L.; ROLDÁN, J. E.; HARTMAN, D. L.; BLISS, S.B.; BLANCHARD, T. L.; HAYDEN, S. S.; HINRICHS, K. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 143–152, 2011.
- CLARK, K. E.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; SEIDEL JR, G. E. Viability of stored equine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 2, p. 534-542, 1987.
- CLARK, K. E.; SQUIRES, E. L.; TAKEDA, T.; SEIDEL JR, G. E. Effect of culture media on viability of equine embryos *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v.17, n. S3, p. 35, 1985.

- COOK, V. M.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; BAILEY, J.; LONG, P. L. Pregnancy rates of cooled, transported equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 80-81, 1989.
- CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J. J.; VETTORAZZI, M. L.; MARTÍNEZ-BOVÍ, R. eCG concentrations, luteal structures, return to cyclicity, and post abortion fertility in embryo transfer recipient mares. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1003-1013, 2015.
- CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. Horse embryo diameter is influenced by the embryonic age but not by the type of semen used to inseminate donor mares. **Theriogenology**, v. 115, p. 90-93, 2018.
- EL-GAYAR, M.; HOLTZ, W. Transfer of sexed caprine blastocysts freshly collected or derived from cultured morulae. **Small Ruminant Research**, v. 57, n. 2-3, p. 151-156, 2005.
- FERRIS, R. A.; MCCUE, P. M.; TRUNDELL, D. A.; MORRISSEY, J. K.; BARFIELD J.P. Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.100, n. 41, p. 64-65, 2016.
- FUKUSHIMA, Y.; MUKOYMA, H.; SATO, F.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; MURAMATSU, S. Sex determination of equine somatic and germ cells by PCR amplification based on the sequence polymorphism of X- and Y-chromosomal amelogenin genes. **Animal Science Journal (Japan)**, 1999.
- GOMES, L. P. M.; GAVIOLI, D.; JACOB, J. F.; CRESPILO, A. M.; CARDOSO, C. E.; GOMES, G. M. Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós-transferência de embriões. **Revista Saúde**, v. 5, n. 1/2, p. 23-27, 2014.
- GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M. M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.
- GRODY, W. W.; NAKAMURA, R. M.; STROM, C. M.; KIECHLE, F. L. **Molecular diagnostics: techniques and applications for the clinical laboratory**. Academic Press, 1st ed. Oxford:UK, 2009.
- GUIGNO, T.F.; BLARD, T.; BARRIERE, P.; GASGOGNE, T.; GAUDE, Y.; YVON, J.M. Easy quick and cheap technique to cryopreserve Welsh B pony blastocyst. **J Equine Vet Sci** v. 41, p.53, 2016.
- HANDYSIDE, A. H.; KONTOGIANNI, E. H.; HARDY, K.; WINSTON, R. M. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, v.344, p. 768-770, 1990.
- HAQQI, T. M.; SARKAR, G.; DAVID, C. S.; SOMMER, S. S. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 24, p. 11844, 1988.
- HARDY, K.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. L. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. **Development**, v. 107, n. 3, p. 597-604, 1989.

HASEGAWA, T.; SATO, F.; ISHIDA, N.; FUKUSHIMA, Y.; MUKOYAMA, H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 62, n. 10, p.62-1109, 2000.

HASLER, J. F.; CARDEY, E.; STOKES, J. E.; BREDBACKA, P. Non-electrophoretic PCR sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenology**, v. 58, n. 8, p. 1457-69, 2002.

HERRERA, C.; MORIKAWA, M. I.; BELLO, M. B.; VON MEYEREN, M.; CENTENO, J. E.; DUFOURQ, P.; MARTINEZ, M. M.; LLORENTE, J. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 758-763, 2014.

HERRERA, C.; MORIKAWA, M. L.; BELLO, M. B.; VON MEYEREN, M.; EUSEBIO J. C.; DUFOURQ, P.; MARTINEZ, M. M.; LLORENTE, J. Blastocoele Fluid vs. Embryonic Cells for Sex Determination in Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 197, 2018.

HERRERA, C.; MORIKAWA, M. L.; CASTEX, C. B.; PINTO, M. R.; ORTEGA, N.; FANTI, T.; GARAGUSO, R.; FRANCO, M. J.; CASTAÑARES, M.; CASTAÑEIRA, C.; LOSINNO, L.; MIRAGAYA, M. H.; MUTTO, A. Blastocoele fluid from *in vitro* and *in vivo* produced equine embryos contains nuclear DNA. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 415-420, 2015.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H. Equine embryo biopsy, genetic testing, and cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 7, p. 390-396, 2012.

HUHTINEN, M.; BREDBACKA, P.; KOTILAINEN, T. Nonsurgical Transfer of 4', 6'-Diamidino-2-Phenylindole-Stained Equine Demi-Embryos Treated with Cytochalasin B and Nocodazole. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. monograph_series1, p. 325-328, 1995.

HUHTINEN, M.; PEIPPO, J.; BREDBACKA, P. Transferência bem-sucedida de embriões equinos biopsiados. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 361-367, 1997a.

HUHTINEN, M.; LAGNEAUX, D.; KOSKINEN, E.; PALMER, E. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. S25, p. 94-97, 1997b.

IETS. Data Retrieval Committee. In: Embryo Technology Newsletter, v. 39, n.4, 2021

IMEL, K. J.; SQUIRES, E. L.; ELSDEN, R. P.; SHIDELER, R. K. Collection and transfer of equine embryos. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 10, p. 987-991, 1981.

KIRKPATRICK, B. W.; MONSON, R. L. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. **Reproduction**, v. 98, n. 2, p. 335-340, 1993.

MCCUE, P. M.; DELUCA, C. A.; WALL, J. J. Cooled transported embryo technology. In: **Equine reproduction**. 2nd ed. Oxford: Black well publishing; 2011. p. 2880-86.

MCCUE, P. M.; DELUCA, C. A.; FERRIS, R. A.; WALL, J. J. How to evaluate equine embryos. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, Las Vegas, v. 55, p. 252-255, 2009.

- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 192, p. 401-406, 1988a.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 4, n. 2, p. 305-333, 1988b.
- MEIRA, C.; HENRY, M.; Evaluation of 2 nonsurgical equine embryo transfer methods. *Journal of Reproduction and Fertility*. Cambridge: J Reprod Fertil Inc., p. 712-713, 1991.
- MIDDELBURG, K. J.; HEINEMAN, M. J.; HAADSMA, M. L.; BOS, A. F.; KOK, J. H.; HADDERS-ALGRA, M. Neurological condition of infants born after in vitro fertilization with preimplantation genetic screening. **Pediatric research**, v. 67, n. 4, p. 430-434, 2010.
- MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; DAEL, P. F.; BRUYAS, J. F. Effect of embryo age on the viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 11, pág. 529-534, 2006.
- MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J.F.; DAEL, P.F. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and emcare holding solutions. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 755-757, 2002.
- MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J.F.; DAEL, P.F. In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, pág. 1615-1625, 2003.
- MOUSSA, M.; TREMOLEDA, J. L.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J. F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; DAELS, P. F. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 921-932, 2004.
- MOYA-ARAUJO, C. F.; ARAUJO, G. H. M.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 58-66, 2010.
- MUKHOPADHYAY, P.; RAJESH, M.; HASKÓ, G.; HAWKINS, B. J.; MADESH, M.; PACHER, P. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2295-2301, 2007.
- NAKAHORI, Y.; HAMANO, K.; IWAYA, M.; NAKGOME, Y. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. **American journal of medical genetics**, v. 39, n. 4, p. 472-473, 1991.
- NASCIMENTO JÚNIOR, A. D. D.; MARQUES, J. C. C.; CEZAR, A. R. R.; BATISTA, A. M.; KASTELIC, J. P.; CÂMARA, D. R. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase without abainide trimental to equine blastocysts. **Animal Reproduction**, v. 17, 2020.
- OBERSTEIN, N.; O'DONOVAN, M. K.; BRUEMMER, J. E.; SEIDEL JR, G. E.; CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. **Theriogenology**, v. 55, n. 2, p. 607-613, 2001.
- OGILVIE, C. M.; BRAUDE, P. R.; SCRIVEN, P. N. Preimplantation genetic diagnosis an overview. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 3, p. 255-260, 2005.

- PARIA, N.; RAUDSEPP, T.; PEARKS WILKERSON, A. J.; O'BRIEN, P.C.; FERGUSON-SMITH, M. A.; LOVE, C. C.; CHOWDHARY, B. P. A gene catalogue of the euchromatic male-specific region of the horse Y chromosome: comparison with human and other mammals. **PLoSOne**, v. 6, n. 7, p. e21374, 2011.
- PALINI, S.; GALLUZZI, L.; DE STEFANI, S.; BIANCHI, M.; WELLS, D.; MAGNANI, M.; BULLETTI, C. Genomic DNA in human blastocoele fluid. **Reproductive biomedicine online**, v. 26, n. 6, p. 603-610, 2013.
- PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 44, n. 5, p. 619-627, 1995.
- PEREZ-MARIN, C. C.; VIZUETE, G.; VAZQUEZ-MARTINEZ, R.; GALISTEO, J. J. Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos. **Equine veterinary journal**, v. 50, n. 3, p. 398-404, 2018.
- RIERA, F. L.; ROLDÁN, J. E.; ESPINOSA, J. M.; FERNANDEZ, J. E.; ORTIZ, I.; HINRICHS, K. Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. **Reproduction, Fertility and Development**. 2019.
- RIERA, L. F.; ROLDÁN, J. E.; GRUNWALDT, M.; VELEZ, I.C.; CHOI, Y. H.; HINRICHS, K. From commercial embryo transfer to assisted reproduction technology. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 32, p. 404, 2012.
- RUBESSA, M.; WHEELER, M. B. Label-free microscopy: A non-invasive new tool to assess gametes and embryo quality. **Theriogenology**, v. 150, p. 241-246, 2020.
- SANDELL, L.; INMAN, K.; TRAINOR, P. DAPI staining of whole-mount mouse embryos or fetal organs. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 10, p. pdb. prot094029, 2018.
- SCHILLING, E.; NIEMANN, H.; CHENG, S. P.; DOEPKE, H. H. DAPI-Further fluorescence test for diagnosing the viability of early cow and rabbit embryos. **Zuchthygiene-reproduction in domestic animals**, v. 14, n. 4, p. 170-172, 1979.
- SCOTT JR, R. T.; UPHAM, K. M.; FORMAN, E. J.; ZHAO, T.; TREFF, N. R. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. **Fertility and sterility**, v. 100, n. 3, p. 624-630, 2013.
- SEIDEL JR, G. E.; CULLINGFORD, E. L.; STOKES, J. E.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M. Pregnancy rates following transfer of biopsied and/or vitrified equine embryos: evaluation of two biopsy techniques. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 121, p. 297-298, 2010.
- SESHAGIRI, P. B.; BAVISTER, B. D. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the "Crabtree effect". **Molecular reproduction and development**, v. 30, n. 2, p. 105-111, 1991.
- SKIDMORE, J.; BOYLE, M. S.; CRAN, D.; ALLEN, W. R. Micromanipulação de embriões equinos para produzir gêmeos monozigóticos. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, pág. 126-128, 1989.
- SQUIRES, E. Current reproductive Technologies impacting equine embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102981, 2020.

SQUIRES, E. L.; IMEL, K. J.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer programme. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 32, p. 409, 1982.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 91-104, 1999.

STORR, A.; VENETIS, C.A.; COOKE, S.; KILANI, S.; LEDGER, W. Inter-observer and intra observer agreement between embryologists during selection of a single Day 5 embryo for transfer: a multicenter study. **Human Reproduction**. p. 32:307e14, 2017.

STOUT, T. A. E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal reproduction science**, v. 87, n. 3-4, p. 269-281, 2005.

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T. A. E. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. **Reproduction**, v. 129, n. 6, p. 789-798, 2005.

TREMOLEDA, J. L.; VAN HAEFTEN, T.; STOUT, T. A.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Cytoskeleton and chromatin reorganization in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection: patterns associated with normal and defective fertilization. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 1, p. 186-194, 2003.

TROEDSSON, M. H. T.; PAPROCKI, A. M.; KOPPANG, R. W.; SYVERSON, C. M.; GRIFFIN, P.; KLEIN, C.; DOBRINSKI, J. R. Transfer success of biopsied and vitrified equine embryos. **Anim. Reprod. Sci**, v. 121, n. Suppl 1, p. S295-S296, 2010.

VANDERLEY, C. S. B. S.; SANTANA, I. C. H.; *Histologia e embriologia animal comparada*. 2. ed. Fortaleza :EdUECE. Cap 4. P 46 – 48. 2015.

VANDERWALL, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 61-83, 1996.

VANDORMAEL-POURNIN, S.; FRACHON, E.; GOBAA, S.; COHEN-TANNOUD, J.I. Microfabricated Device for High-Resolution Imaging of Preimplantation Embryos. In: **Epigenetic Reprogramming During Mouse Embryogenesis**. Humana, New York, NY, p. 11-30, 2021.

WHITESELL, K.; STEFANOVSKI, D.; MCDONNELL, S.; TURNER, R. Evaluation of the effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions. **Theriogenology**, v. 142, p. 67–76, 2020.

WILSHER, S.; RIGALI, F.; KOVACSY, S.; ALLEN, W.R. Puncture of the equine embryonic capsule and its repair in vivo and in vitro. **J Eq Vet Sci**, v. 93, pág. 103-194, 2020.

WILSHER, S.; RIGALI, F.; COUTO, G.; CAMARGO, S.; ALLEN, W.R. Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid. **Equine Vet J**, v. 51, pág. 500-5, 2018.

WU, Y.; LV, Z.; YANG, Y.; DONG, G.; YU, Y.; CUI, Y.; SHA, J. Blastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 9, p. 1761-1774, 2014.

ZHAO, H. C.; ZHAO, Y.; LI, M.; YAN, J.; LI, L.; LI, R.; QIAO, J. Aberrant epigenetic modification in murine brain tissues of off spring from preimplantation genetic diagnosis blastomere biopsies. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 5, p. 117, 1-10, 2013.

ZIV, N. E.; SCHILLER, J. Differential interference contrast (DIC) imaging of living cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2007, n. 7, p. pdb. prot4787, 2007. pdb-prot4787.

ZUCKER, R. M.; ROGERS, J. M. Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis stage mouse embryos. In: **Developmental Toxicology**. Humana, New York, NY, p. 297-311, 2019.

CAPÍTULO 2

Este trabalho, será submetido ao periódico da Revista Theriogenology

ARTIGO CIENTÍFICO

SEXAGEM E ACONDICIONAMENTO DE EMBRIÕES EQUINOS PRÉ- IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN VIVO*

Sexing and stowage of equine preimplantation embryos produced in vitro

Giovana Siqueira Camargo¹| Fernanda Saules Ignácio¹ | José Paes Oliveira-Filho¹ | Heloisa Siqueira Canesin²| Cristiana RaachBromberger¹ |Luiz Daniel de Barros¹ | Gustavo Henrique Marques Araujo³ | Luciane Alarcao Dias⁴| Leandro Alves dos Santos⁴ | Cezinande de Meira¹|

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Laboratório de Embriologia, CH Reprodução Equina, Adamantina, São Paulo, Brasil.

³Universidade Federal de Jataí, UFJ, Jataí, Goiás, Brasil

⁴Laboratório de Microscopia Confocal, Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente:

E-mail: giovana.camargo@unesp.br (SG Camargo)

fernanda.s.ignacio@unesp.br(SF Ignácio)

Resumo

O presente estudo teve como objetivo (1) testar a técnica de sexagem por PCR do FB de embriões pré-implantacionais produzidos *in vivo* coletado a partir do colapso embrionário com agulha hipodérmica; (2) avaliar a capacidade de re-expansão embrionária após acondicionamento destes embriões colapsados; (3) avaliar a qualidade e tamanho dos embriões colapsados e íntegros, após simulação de transporte sob acondicionamentos em temperatura ambiente (25°C) e refrigeração à 5°C por 24 horas. *I-* Foram coletados 42 embriões e distribuídos aleatoriamente entre quatro grupos experimentais: CTA (colapsados acondicionados em temperatura ambiente n=11), CTR (colapsados acondicionados sob refrigeração n=11), NCTA (não colapsados acondicionados em temperatura ambiente n=10) e NCTR (embriões não colapsados acondicionados sob refrigeração n=10), todos armazenados por um período de 24 horas. *II-* As amostras de FB (n=19) foram coletadas após o colapso dos embriões com agulha hipodérmica 26G, dos grupos CTA e CTR, e foram submetidas à PCR e *Nested* PCR com os primers específicos TSPY e AMEL para a identificação dos sexos. *III-* Apenas três embriões (n=1 CTA, n=1 CTR, e n=1 imediatamente após o colapso) foram submetidos a microscopia por fluorescência com marcador DAPI e microscopia de interferência de contraste para uma análise descritiva. *I-* Todos embriões colapsados reduziram o tamanho após as 24h, mas os acondicionados em temperatura ambiente demonstraram uma melhor qualidade morfológica após 24h. Apenas o grupo NCTA obtiveram uma taxa de crescimento positiva (+25,95%) e mantiveram sua qualidade excelente em M24, enquanto que os refrigerados a 5°C apresentou uma queda com 20% de degenerados após as 24h. *II-* A técnica de sexagem por FB diagnosticou 57,90% de machos, com gene TSPY através da PCR. *III-* A lesão embrionária causada pelo colapso manual foi visualizada por microscopia de fluorescência. É possível realizar a sexagem embrionária por meio do FB através da PCR, e os embriões colapsados são capazes de se recuperar parcialmente das lesões, principalmente quando acondicionados em meio de manutenção por até 24h. E a temperatura ambiente (25°C) demonstrou ser o melhor tipo de acondicionamento para o transporte de embriões equinos íntegros e colapsados por até 24h, por atuar diretamente otimizando a qualidade morfológica durante as 24hrs. Estudos complementares são necessários para comprovar a viabilidade embrionária pós-colapso com testes *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: colapso embrionário, blastocele, armazenamento, temperatura, transporte.

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma tecnologia amplamente aplicada a campo e com reflexo direto sobre o mercado equestre que, em associação com outras biotecnologias como o transporte dos embriões [1] e a sexagem embrionária [2,3,4], potencializa a produção de animais de maior valor comercial [5,6]. O primeiro por possibilitar e por otimizar a comercialização de receptoras e desempenho da doadora [6] e o segundo por direcionar o nascimento de potros de um determinado sexo de maior interesse comercial [2,3,4].

O diagnóstico genético pré-implantacional (Preimplantation Genetics Diagnosis-PGD) é frequentemente utilizado em programas de reprodução assistida em humanos [7,8] e trazem grandes perspectivas para aplicação na espécie equina, tanto para diagnóstico de doenças genéticas como para a sexagem de embriões equinos [2,4, 9,10, 11,12].

Os testes genéticos convencionalmente são realizados a partir da biópsia de células embrionárias [7,8,10,13,14], mas a identificação de DNA livre no fluido da blastocle (FB) em quantidade suficiente para amplificação e identificação do sexo genético de embriões humanos produzidos *in vitro* [15] abriu outras perspectivas.

Com isso, novas pesquisas envolvendo a sexagem de embriões equinos foram realizadas e, com a justificativa de ser uma técnica menos invasiva ao embrião [3,4], a sexagem pela aspiração do FB com uso de uma micropipeta e micromanipulador também foi testada nessa espécie e se mostrou possível [3]. Porém, o alto custo dos equipamentos necessários para a realização tanto da biópsia quanto da aspiração do FB limitam a realização comercial da sexagem, ficando restrita à realização em centros de reprodução de alta biotecnologia [9,12].

A vitrificação de embriões equinos grandes, blastocistos expandidos produzidos *in vivo*, também passa por essas mesmas questões. A aspiração do FB e perfuração da cápsula são necessárias para que o procedimento seja viabilizado nesta categoria de embriões e para isso o micromanipulador é utilizado [16,17,18]. Dentro deste contexto, um estudo realizou o colapso embrionário por perfuração com uma agulha hipodérmica 26G previamente à vitrificação e os estes embriões alcançaram uma taxa de prenhez satisfatória, de 46% (7/15) [19], o que demonstra uma certa resistência dos embriões ao procedimento.

Foi a partir da associação destes dois achados, a possibilidade da sexagem pelo FB e de viabilidade dos embriões após perfuração com agulha hipodérmica, que em 2017 foi aplicada pela primeira vez em pesquisa a técnica de perfuração embrionária com agulha hipodérmica 26G para obtenção do FB para sexagem por meio da PCR, e com isso os autores

conseguiram sexar 55,6% (5/9) dos embriões produzidos *in vivo* com o uso dessa técnica prática e de menor custo para implementação [20].

Outra biotécnica de grande impacto nos programas de TE é o transporte de embriões [21,22,29]. Entretanto, os estudos que embasam as técnicas de transporte e acondicionamento dos embriões equinos são antigos [23,24,25,26,27] sendo poucos os estudos atuais que testam as condições disponíveis atualmente [21,26,28,29,]. Sendo assim, a avaliação do transporte ou acondicionamento de embriões pós-colapso destinados à sexagem torna-se importante para garantir a qualidade destes no momento da transferência.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivos: (1) testar a técnica de sexagem por PCR do FB de embriões pré-implantacionais produzidos *in vivo* a partir da perfuração embrionária com agulha hipodérmica 26G; (2) avaliar a capacidade de re-expansão embrionária após acondicionamento destes embriões produzidos *in vivo* colapsados; (3) avaliar a qualidade e tamanho de embriões produzidos *in vivo*, colapsados e íntegros, após simulação de transporte sob acondicionamentos em temperatura ambiente e refrigeração a 5°C por 24 horas.

2. METODOLOGIA

2.1. Aspectos éticos

Os aspectos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Experimento Animal (CONCEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela Comissão Institucional de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 185/2020.

2.2. Animais e grupos experimentais

A pesquisa foi realizada na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), na estação de monta de 2020/2021 e 2021/2022, utilizando 20 éguas, sem raça definida com idade entre 5 e 15 anos, da Área de Reprodução Animal e Posto de Monta – FMVZ, localizado no Campus de Botucatu-SP, situado à latitude de 22°53'09" sul e longitude de 48°26'42" oeste, estando a uma altitude de 804 metros.

Os 42 embriões obtidos das éguas doadoras foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo CTA (n = 11; embriões colapsados submetidos à sexagem e ao armazenamento em temperatura ambiente no período de 24 horas), Grupo CTR (n = 11; embriões colapsados submetidos à sexagem e ao armazenamento em refrigeração a 5°C no período de 24 horas), Grupo NCTA (n = 10; embriões não colapsados submetidos ao armazenamento em temperatura ambiente no período de 24 horas) e Grupo NCTR (n = 10;

embriões não colapsados submetidos ao armazenamento em refrigeração a 5°C no período de 24 horas).

2.3. *Preparação das doadoras*

Foi realizado o acompanhamento do crescimento folicular das éguas doadoras por palpação e ultrassonografia transretal uma vez ao dia, com ultrassom Mindray DP-10®. Aquelas que apresentaram folículos maiores ou igual a 35 mm e edema uterino grau 2 a 3 [30] tiveram a ovulação induzida com 1mg de deslorelina (Sincrorrelin®, Ourofino Saúde Animal) por via intramuscular seguida da inseminação artificial após 24 horas da indução, com sêmen fresco e/ou resfriado diluído na dose de 1×10^9 células espermáticas móveis, obtidos de 4 garanhões com qualidade espermática e fertilidade comprovadas. A partir da determinação do dia da ovulação (D0), os embriões de 8 dias foram coletados por lavagem uterina [31].

2.4. *Manipulação e colapso*

Imediatamente após o lavado uterino, o filtro foi levado ao laboratório onde o conteúdo foi transferido para uma placa de petri (90X15mm). Após a identificação do embrião em estereomicroscópio, este foi lavado em 10 gotas de meio comercial de manutenção embrionária (TQC Holding Embryo life Vitrocell®, Campinas-SP, Brasil). O mesmo processo de manipulação e lavagem foi repetido para todos os embriões nos quatro grupos experimentais (CTA, CTR, NCTA e NCTR).

Para realização do colapso, os embriões foram colocados em uma gota de 50 μ L de meio de manutenção (TQC Holding Embryo life Vitrocell®), em uma placa de petri (55X15mm), estabilizado entre simples ranhuras feitas manualmente no fundo da placa com uma agulha 30 X 0,8 mm estéril (Fig. 1). A perfuração do embrião foi realizada com agulha hipodérmica 13 x 0,45mm (26G) mediante visualização do colapso por estereomicroscópio Nikon SMZ800N® (Fig. 1). O FB extravasado após o colapso, juntamente com os 50 μ L do meio foram aspirados com uso de uma micropipeta e armazenados em tubos Eppendorfs® estéril de 2mL para imediata congelação em freezer a -20°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para sexagem.

Para que não houvesse ressecamento, mais meio de manutenção foi adicionado aos embriões imediatamente após a remoção do volume do meio + FB para sexagem. Os embriões foram então transferidos para criotubos estéreis. A partir daí, os embriões foram

destinados à simulação de transporte e acondicionamento específico para cada grupo experimental.

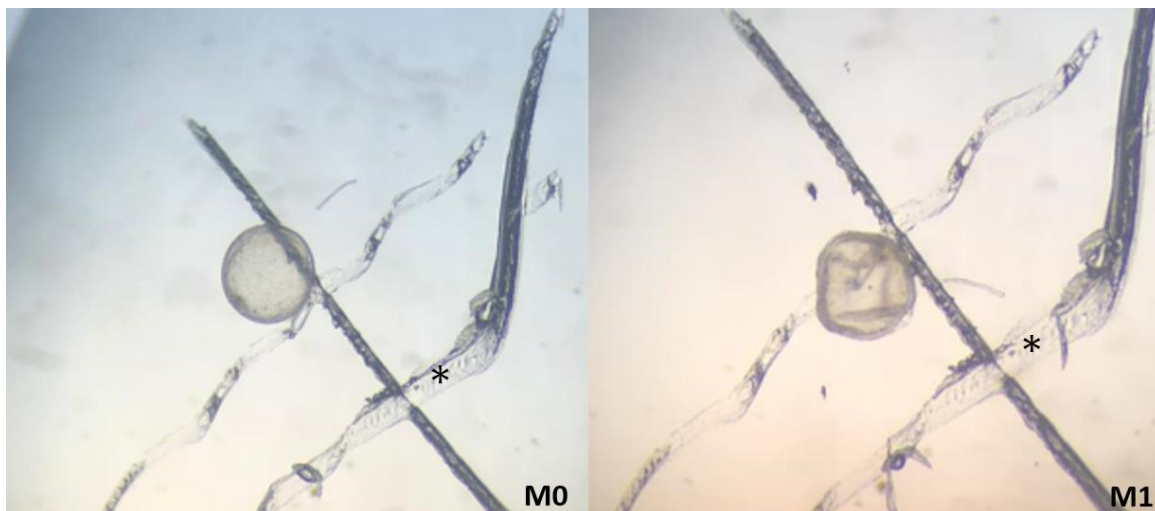


Figura 1. Em M0, imagem de embrião Grau 1 (excelente) imediatamente após a recuperação por lavado uterino e, em M1, momento após realização do colapso embrionário por perfuração com agulha hipodérmica 26G. (*) Ranhuras realizadas no fundo da placa com o uso de agulha hipodérmica estéril para estabilização do embrião na hora da perfuração.

2.5. Avaliação morfológica dos embriões

Todos os embriões, dos quatro grupos, passaram por avaliações em três momentos. No primeiro momento (M0), as avaliações foram realizadas logo após a recuperação e lavagem do embrião; no segundo momento (M1) foram realizadas imediatamente após o colapso; e no terceiro momento (M24), após a simulação de transporte por 24h. Em M0 e M24 foram avaliados: a fase de desenvolvimento embrionário (blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) ou blastocisto expandido (Bx)), a mensuração do diâmetro pelo uso de régua micrométrica e o grau de qualidade morfológica (1 – 5) [32]. Em M1 foram feitas imagens e uma avaliação descritiva da detecção do colapso (Fig. 1). A avaliação morfológica subjetiva da qualidade dos embriões foi realizada por dois avaliadores de maneira independente.

Devido as grandes diferenças entre embriões classificados dentro de um mesmo grau de qualidade em decorrência da re-expansão pós colapso, a classificação de 1 a 5 [32] foi adaptada e os graus 2 e 3 foram subdivididos em grau 2+, 2-, 3+ e 3-. Esta classificação foi adaptada para todos os embriões. Isso permitiu uma avaliação mais criteriosa dos embriões conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação morfológica descritiva adaptada de McKinnon e Squires (1988b).

GRAU(1-5) CLASSIFICAÇÃO		DESCRIÇÃO	
1	Excelente		Sem anormalidades observadas, esférico, células uniformes em tamanho, cor e textura, tamanho e estágio de desenvolvimento compatíveis com a idade pós-ovulação.
2 +	Bom +		Pequenas imperfeições, com poucos blastômeros extrusados e debris, poucas irregularidades em forma, tamanho, cor ou textura; pequenas separações entre trofoblasto e zona pelúcida ou cápsula.
2 -	Bom -		Mesmas características descritas para o grau 2+, porém com as alterações morfológicas visualmente mais evidenciadas.
3 +	Pobre +		Imperfeições de níveis moderados, como grande porcentagem de blastômeros degenerados ou debris, colapso parcial da blastocele ou contrações moderadas do trofoblasto da cápsula
3 -	Pobre -		Mesmas características descritas para grau 3+, porém com as alterações morfológicas visualmente mais evidenciadas
4	Degenerado		Problemas graves e facilmente identificados, como alta % de blastômeros extrusados, e colapso completo da blastocele, ruptura da cápsula, ou completa degeneração e morte embrionária
5	UFO		Oócito não fecundado (chatos, não rolam, tipo prato)

2.6. Simulação de transporte e Acondicionamento do embrião

Todos os embriões foram transferidos individualmente para criotubos estéreis de 2mL que foram preenchidos com meio de manutenção e acondicionados em caixas isotérmicas (BotuFlex®, Botupharma, Botucatu-SP) para simulação de transporte por 24h conforme temperatura definida para cada grupo.

Para os grupos nos quais os embriões foram acondicionados à temperatura ambiente (CTA e NCTA), o criotubo contendo o meio com o embrião foi protegido por uma camada externa de algodão envolvendo o criotubo e encaixado no centro da caixa isotérmica sem gelo. A temperatura dos dias de realização do experimento foi acompanhada pelo site AccuWeather e apresentou temperatura média de 25°C (variação de 24,5°C a 25,5°C).

Para os grupos nos quais os embriões foram refrigerados a 5°C (CTR e NCTR) em caixa isotérmica própria para transporte de sêmen equino, o criotubo foi protegido com algodão e, adjacente a ele, dois frascos com água completando o volume de 150mL foram colocados. No mesmo momento, dois gelos recicláveis também foram colocados de acordo com as recomendações do fabricante da caixa para curva de refrigeração até 5°C.

Após o período de 24 horas as avaliações dos embriões em M24h foram realizadas conforme descrito no item 2.5.

2.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As análises da PCR foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Clínicas Veterinária (LBMCV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP Botucatu). Todas as etapas foram realizadas com vestimentas apropriadas sob fluxo laminar e estufa, com materiais esterilizados e descartáveis para minimizar o risco de contaminação do material genético.

Um total de 22 amostras de FB de diferentes embriões foram submetidos à duas PCR sequenciadas para identificação do sexo, porém 3 amostras foram utilizadas para os testes iniciais e por falta de volume, apenas 19 amostras foram analisadas. Para o controle positivo das reações de PCR foram utilizadas amostras de sangue de equídeos (macho e fêmea). Utilizando para a extração de DNA do sangue o kit comercial (Relia Prep™ Blood gDNA Miniprep System, Promega®, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Para as amostras de células embrionárias, o material foi submetido à extração de DNA por meio da utilização de um kit comercial (PureLink™ genomic DNA kit) da marca Invitrogen™ (Thermo Fischer Science®, Waltham, Massachusetts, EUA), também seguindo as recomendações do fabricante.

A extração do DNA não foi realizada das amostras do FB uma vez que encontra-se livre na blastocle [2,20] e o material genético foi submetido diretamente à reação da PCR.

Os primers (oligonucleotídeos indiadores) utilizados foram: AMEL-F (5'-CCAACCAACACCAGCCAAACCTCCCT-3'), AMEL-R (5'-AGCTAGGGGGCAAGGGCTGCAAGGGGAAT-3'), TSPY-F (5'-

GAAGTCAGGCACACCAGTGA-3') e TSPY-R (5'-TAAGGCTGCAGTTGTCATGC-3'), conforme previamente descritos [33,34, 20], especificamente da marca Invitrogen™ (Thermo Fischer Science®, Waltham, Massachusetts, EUA). O gene indicador do cromossomo Y (Macho) é o primer TSPY que contém 280 pares de bases (bp) e deve formar uma banda na visualização da eletroforese. O primer AMEL pode indicar o sexo masculino ou feminino dependendo do número de bases de pares, o gene indicador do cromossomo X (Fêmea) contém 184 bp e deve formar apenas uma banda, já o gene indicador do cromossomo Y (Macho) contém 160 a 240 bp e deve formar uma banda dupla.

O volume total de reação para amplificação foi de 25 µL, [12,5µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega™), 6,5µL de H₂O ultrapura estéril, 0,5µL de primer forward e 0,5µL de primer reverset] e 5µL de amostra de DNA. As reações foram feitas separadas individualmente para cada primer (TSPY e AMEL) e como controle negativo foi utilizado a H₂O ultra pura estéril. Todas as etapas de preparação do mix e pipetagem de amostras foram feitas sob fluxo laminar, previamente com higienizados com álcool 70% e esterilização por luz UV.

As reações foram destinadas ao termociclador Eppendorf® (Hambrug, Germany), e a amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas de termociclagem: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos.

Os produtos finais da amplificação da PCR foram submetidos à eletroforese em gel agarose 1,5%, sob uma corrente elétrica de 80 voltz e 100 amperes por 40 minutos à 1 hora. Posteriormente, a leitura e visualização das bandas foram feitas sob luz UV em um transiluminador e foto-documentadas no ImageQuant®imager 300 (GE Healthcare).

Os produtos finais amplificados na 1ª reação da PCR, citados acima, que não apresentaram resultados foram submetidos à uma segunda etapa de amplificação, foram colocados em uma diluição com H₂O ultra pura estéril na proporção 1:0, 1 µL amostra: 9 µL H₂O (10%) e 1:99µL (100%). Em seguida, 5µL desse produto amplificado diluído foi destinado para uma 2ª reação da PCR sob as mesmas etapas de termociclagem e posteriormente eletroforese. Para reduzir o potencial de contaminação do material genético amplificado, as etapas dessa segunda amplificação foram realizadas em fluxo laminares diferentes e em salas separadas.

2.8. *Microscopia de fluorescência e microscopia de contraste de interferência (DIC)*

As análises dos embriões por microscopia de fluorescência e microscopia de contraste de interferência (DIC) foram realizadas no Laboratório de Microscopia de Confocal localizado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) pertencente à Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/ UNESP).

Para análise descritiva da lesão embrionária causada através da perfuração manual com a agulha hipodérmica 26G, três embriões colapsados foram fixados em solução de formoldeído a 10% em diferentes momentos e/ou condições para serem avaliados. O primeiro imediatamente após o colapso, o segundo 24h após colapso e acondicionamento em temperatura ambiente (grupo CTA) e o terceiro 24h após colapso e refrigeração a 5°C (grupo CTR).

Foi utilizado marcador fluorescente 4',6'diamino-phenylindole (DAPI) especificamente com uma solução comercial de pré montagem (Slowfade™ Dimond Antifade Mountant with DAPI) Invitrogen™ (Thermo Fischer Science®) conforme metodologia previamente descrita [35,36,37]. O protocolo seguiu as seguintes etapas: individualmente os embriões foram lavados em 5 gotas de solução PBS, em seguida foram incubados em uma gota de DAPI por 30 minutos, após esse período foram transferidos para uma gota de glicerol 85% sob uma lâmina escavada e estabilizados por uma lamínula.

Em seguida, a lâmina escavada foi destinada ao microscópio confocal computadorizado Leica TCS SP8, com software LAS (Leica Microsystems®), para realização da varredura a laser em objetiva 10X, zoom 1.64, resolução 2048/speed 600, e step size entorno de 2,00 a 2,40 µm. Após a varredura completa do laser, imagens de alta definição dos embriões foram computadorizadas em dois formatos, um por fluorescência com o marcador DAPI e outro por interferência de contraste através do DIC, podendo assim realizar as observações da lesão embrionária.

2.9. Análise estatística

Foi realizado o Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos em cada momento independente ($P < 0,05$), e quando significativo foi realizado o teste de Dunn para comparação das medianas.

Para comparação dos dois momentos foi realizado o Teste Wilcoxon dentro de cada grupo separadamente ($P < 0,05$). O programa usado foi o sigma stat 3.5.

O Teste Qui-quadrado foi realizado para comparar as taxas de embriões classificados em cada grau de qualidade entre os grupos.

Para comparar as taxas de crescimento de M0 para M24 entre os grupos foi realizada análise de variância seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A taxa de crescimento foi calculada da seguinte forma: $[(\text{tamanho do embrião em M24} - \text{tamanho do embrião em M0}) / \text{tamanho do embrião em M0}] \times 100$.

3. RESULTADOS

3.1. Simulação de transporte e acondicionamento dos embriões.

Um total de 42 embriões blastocistos expandidos foram avaliados e submetidos ao transporte, sendo 22 colapsados (Grupo CTA e CTR) e 20 íntegros (Grupo NCTA e NCTR). Não foi detectada diferença de tamanho [variação de 700 μm a 987,5 μm ($P = 0,057$); Fig. 2] e qualidade dos embriões entre os grupos imediatamente após a coleta em M0 (Fig. 3). No entanto, as condições de acondicionamento do embrião e o procedimento de colapso interferiram no tamanho ($P = 0,002$, Fig. 2) e qualidade do embrião após 24h ($P < 0,001$; Fig. 3) em M24.

Considerando a variável tamanho, o procedimento de colapso seguido do acondicionamento promoveu a redução do diâmetro dos embriões de M0 para M24 tanto para os acondicionados em temperatura ambiente ($P = 0,007$) quanto para os sob refrigeração a 5°C ($P < 0,001$). Para os grupos NCTA e NCTR, houve aumento do tamanho dos embriões em 24h quando mantido em temperatura ambiente ($P = 0,004$) mas não quando sob refrigeração a 5°C ($P = 0,313$). Em M24, o diâmetro foi diferente entre os grupos ($P = 0,002$) conforme demonstrado na Figura 2.

Como os diâmetros dos embriões foram variáveis, as taxas de crescimento dos embriões de M0 a M24 foram avaliadas para uma melhor análise do efeito dos procedimentos, colapso e acondicionamento. O grupo NCTA teve taxa de crescimento positivo e maior que os demais grupos. Já o grupo NCTR apresentou taxa de crescimento maior que os dois grupos submetidos ao colapso (CTA e CTR), como demonstrado na Figura 3. Com exceção do grupo NCTA, os grupos NCTR, CTA e CTR apresentaram taxa de crescimento negativa. Todos os embriões submetidos ao colapso sofreram redução no tamanho em 24h. Dos 10 embriões íntegros submetidos à refrigeração (NCTR), dois apresentaram taxa de crescimento positivo (+20% e +12,5%), dois não alteraram o tamanho (0% e 0%) e seis apresentaram taxa de crescimento negativa.

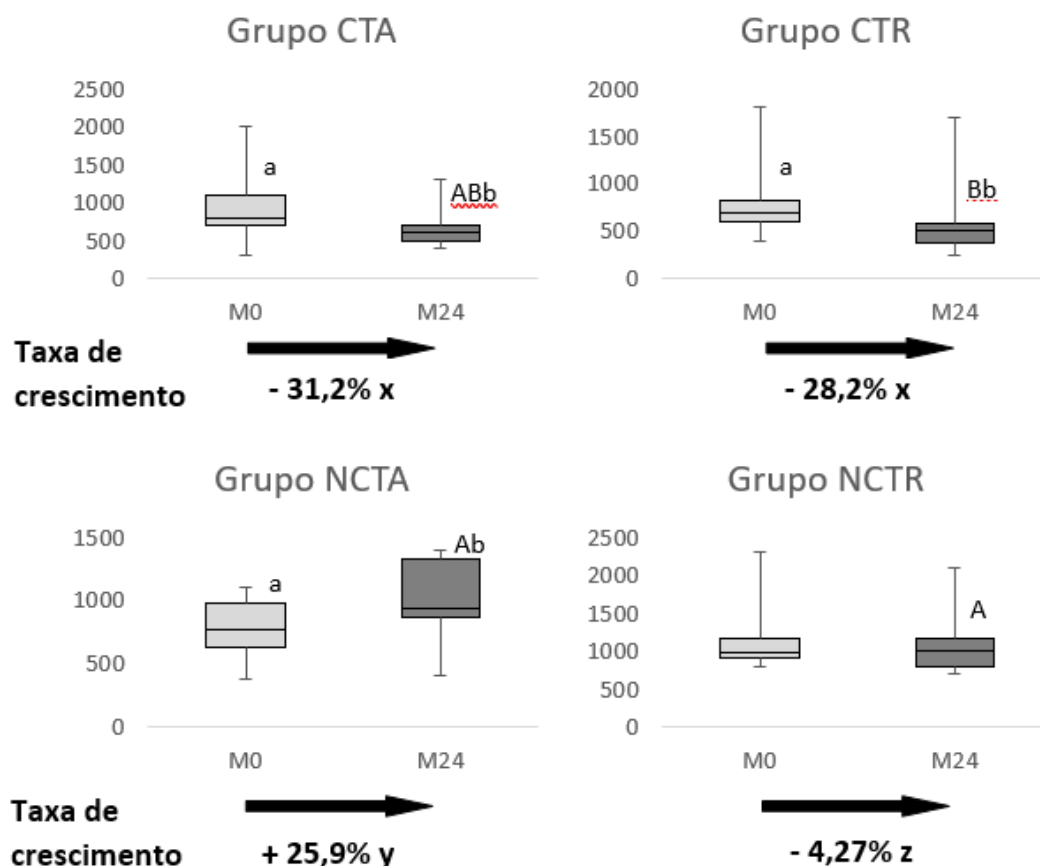


Figura 2. Mediana (percentis 25 e 75%) do tamanho (μm) dos embriões nos dois momentos e média ($\pm\text{SEM}$) da taxa de crescimento embrionário de M0 para M24 dos grupos CTA, CTR, NCTA e NCTR. Letras minúsculas (a,b) diferentes indicam diferença estatística entre momentos (M0 e M24) dentro de cada grupo pelo teste de Dunn ($P < 0,005$). Letras maiúsculas (A,B) diferentes indicam diferença estatística entre grupos no mesmo momento pelo teste de Dunn ($P < 0,005$). Letras minúsculas (x,y,z) diferentes indicam diferença estatística das taxas de crescimento de M0 para M24 entre os grupos realizada pela análise de variância seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

Classificação da qualidade morfológica (%) dos embriões

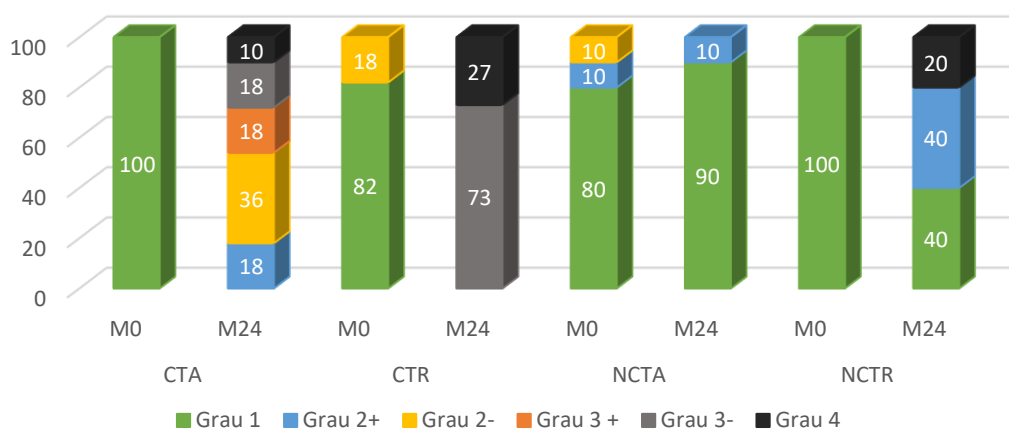


Figura 3. Porcentagem de embriões classificados de grau 1 a 5 segundo classificação descritiva adaptada [32] em M0 e M24 para cada grupo.

A Fig. 3 demonstra a porcentagem de embriões classificados de grau 1 a 5 [32]. A frequência em porcentagem de embriões para cada classificação foi comparada entre os grupos em um mesmo momento. Em M0, avaliação logo após recuperação embrionária, não houve diferença ($P=0,2603$) de frequência dos embriões classificados como grau 1 (excelente), mas os grupos CTR e NCTA apresentaram embriões classificados como grau 2+ e grau 2-, como é possível observar na Figura 3.

Em M24 os embriões do grupo NCTA apresentaram mais ($P<0,001$) embriões classificados em grau 1 (90%) do que o grupo NCTR (40%), enquanto que os grupos colapsados (CTA e CTR), não apresentaram embriões em grau 1 (0%). O grupo NCTR apresentou mais embriões ($P<0,001$) classificados para grau 2+ (40%), do que os grupos CTA e NCTA no qual apresentaram respectivamente 18% e 10% de embriões classificados para o grau 2+, enquanto que o grupo CTR não apresentou embriões com esta classificação (0%). Apenas o grupo CTA apresentou embriões classificados em grau 2- (36%) e grau 3+ (18%). O grupo CTR apresentou mais ($P<0,001$) embriões classificados como grau 3- (73%) do que o grupo CTA (18%), enquanto que os grupos NCTA e NCTR não apresentaram embriões para essa classificação (0%). O grupo CTR apresentou mais ($P<0,001$) embriões classificados em grau 4 (36%) do que o grupo NCTR (20%) e CTA (10%), enquanto que o grupo NCTA não apresentou nenhum embrião com essa classificação (0%).

Nenhum embrião íntegro mantido em temperatura ambiente (NCTA) apresentou redução da qualidade morfológica e um dos embriões classificado como grau 2- em M0 melhorou sua classificação para grau 1 em M24 (embrião 5 da Fig. 4). Em contrapartida, no grupo NCTR, cinco embriões íntegros refrigerados à 5°C tiveram sua qualidade reduzida de M0 para M24 (embriões 4, 5, 6, 8 e 9 da Fig. 5).

O momento pós colapso imediato (M1) permitiu a observação das mudanças imediatas ocorridas no embrião pela perfuração com agulha hipodérmica. Foi possível observar o colapso do embrião, perda do formato esférico com o extravasamento do FB, destacamento da cápsula embrionária, dobramento dos folhetos e cápsula embrionária e, em algumas ocasiões, a extrusão de blastômeros através da lesão (Fig. 6 e 7).

A análise descritiva da morfologia dos embriões colapsados e sua re-expansão após 24h de acondicionamento resultou nas observações que serão descritas a seguir. Dos embriões colapsados do grupo CTA, 91% (10/11) dos embriões apresentavam-se esféricos, porém apresentaram diferentes graus de re-expansão alcançando de 55% a até 167% do tamanho inicial (M0). Apenas um embrião não voltou a forma esférica em 24h, mantendo-

se colapsado, com dobras dos folhetos embrionários. Detalhes das imagens dos embriões podem ser observados na Figura 6.

Dos embriões colapsados do grupo CTR, 72,7% (8/11) não re-expandiram em 24h de refrigeração mantendo-se achatados, com dobras de folhetos embrionários. Apenas 27% (3/11) dos embriões re-expandiram parcialmente e atingiram de 50% a 87% do tamanho inicial (M0). Os embriões com características que não re-expandiram foram classificados como pobre +, pobre – ou degenerados e não apresentarem grandes diferenças micrométricas de tamanho quando comparados aos demais embriões uma vez que o maior diâmetro foi avaliado. Detalhes das imagens dos embriões podem ser observados na Figura 7.


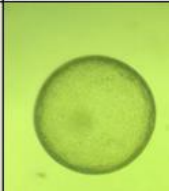

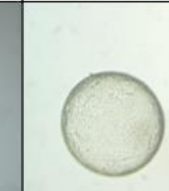

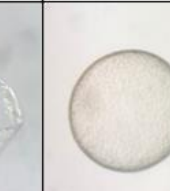
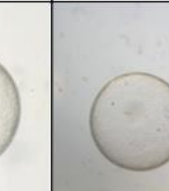

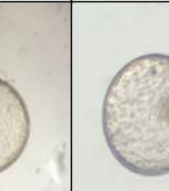
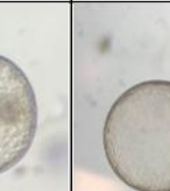



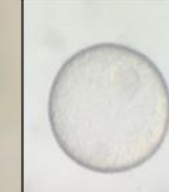

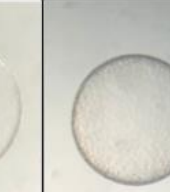
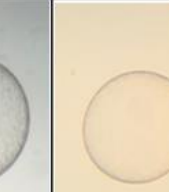
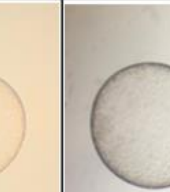
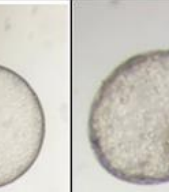
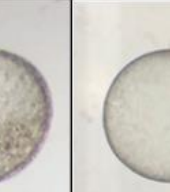
NCTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M0	 G1 1.000 μm	 G1 700 μm	 G1 1.100 μm	 G1 600 μm	 G2- 600 μm	 G1 800 μm	 1.000 μm	 G1 750 μm	 G2+ 375 μm	 G1 900 μm
M24	 G1 1.400 μm	 G1 850 μm	 G1 1.400 μm	 G1 600 μm	 G1 925 μm	 G1 900 μm	 G1 1375 μm	 G1 950 μm	 G2+ 400 μm	 G1 1.200 μm

Figura 4. Embriões correspondente ao grupo não colapsado acondicionado em temperatura ambiente 25°C (NCTA) nos dois momentos: pré-colapso (M0) e 24 horas após acondicionamento (M24), em suas respectivas classificações adaptada [32] e diâmetro (μm).

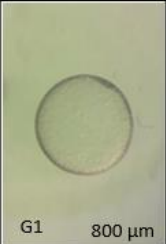

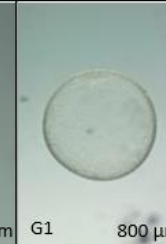



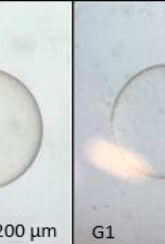
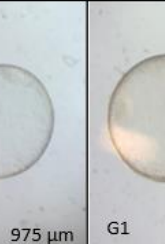


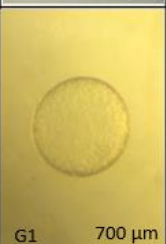

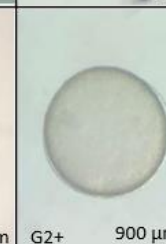






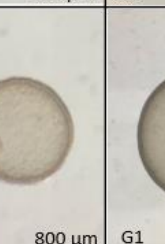
NCTR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
M0	 G1 800 μm	 G1 1.000 μm	 G1 800 μm	 G1 2.300 μm	 G1 900 μm	 G1 1.200 μm	 G1 975 μm	 G1 1.100 μm	 G1 900 μm	 G1 1.200 μm
M24	 G1 700 μm	 G1 1.200 μm	 G2+ 900 μm	 G4 2.100 μm	 G4 750 μm	 G2+ 1.100 μm	 G1 800 μm	 G2+ 1.100 μm	 G2+ 800 μm	 G1 1.200 μm

Figura 5. Embriões correspondente ao grupo não colapsado acondicionado sob refrigeração a 5°C (NCTR) nos dois momentos: pré-colapso (M0) e 24 horas após acondicionamento (M24), em suas respectivas classificações adaptada [32] e diâmetro (μm).



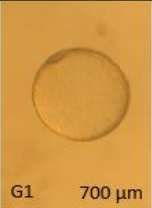
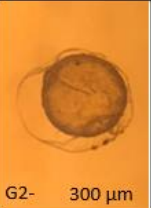
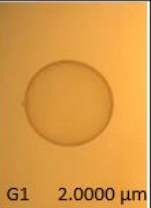







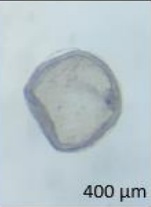

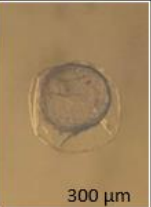


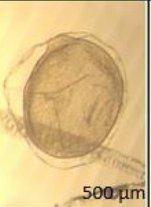
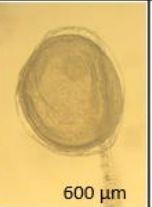

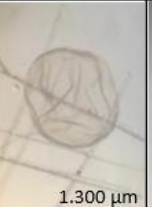
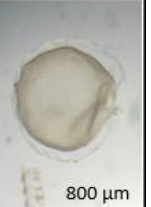

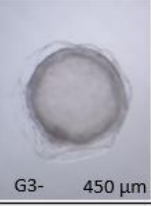

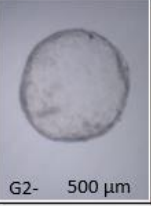






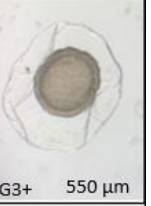
CTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PRÉ COLAPSO (M0)	 G1 1.200 µm	 G1 450 µm	 G1 700 µm	 G2- 300 µm	 G1 2.0000 µm	 G1 800 µm	 G1 700 µm	 G1 800 µm	 G1 700 µm	 G1 2.000 µm	 G1 1.000 µm
PÓS COLAPSO IMEDIATO (M1)	 900 µm	 400 µm	 500 µm	 300 µm	 1.550 µm	 600 µm	 500 µm	 600 µm	 500 µm	 1.300 µm	 800 µm
APÓS 24H (M24)	 G2- 700 µm	 G3- 450 µm	 G3- 500 µm	 G2- 500 µm	 G4 1.150 µm	 G2+ 600 µm	 G3+ 400 µm	 G2+ 600 µm	 G2- 400 µm	 G2- 1.300 µm	 G3+ 550 µm

Figura 6. Embriões correspondente ao grupo colapsado acondicionado em temperatura ambiente 25°C (CTA) nos três momentos: pré-colapso (M0), pós-colapso imediato(M1) e 24 horas após acondicionamento(M24), em suas respectivas classificações adaptada [32] e diâmetro (µm).

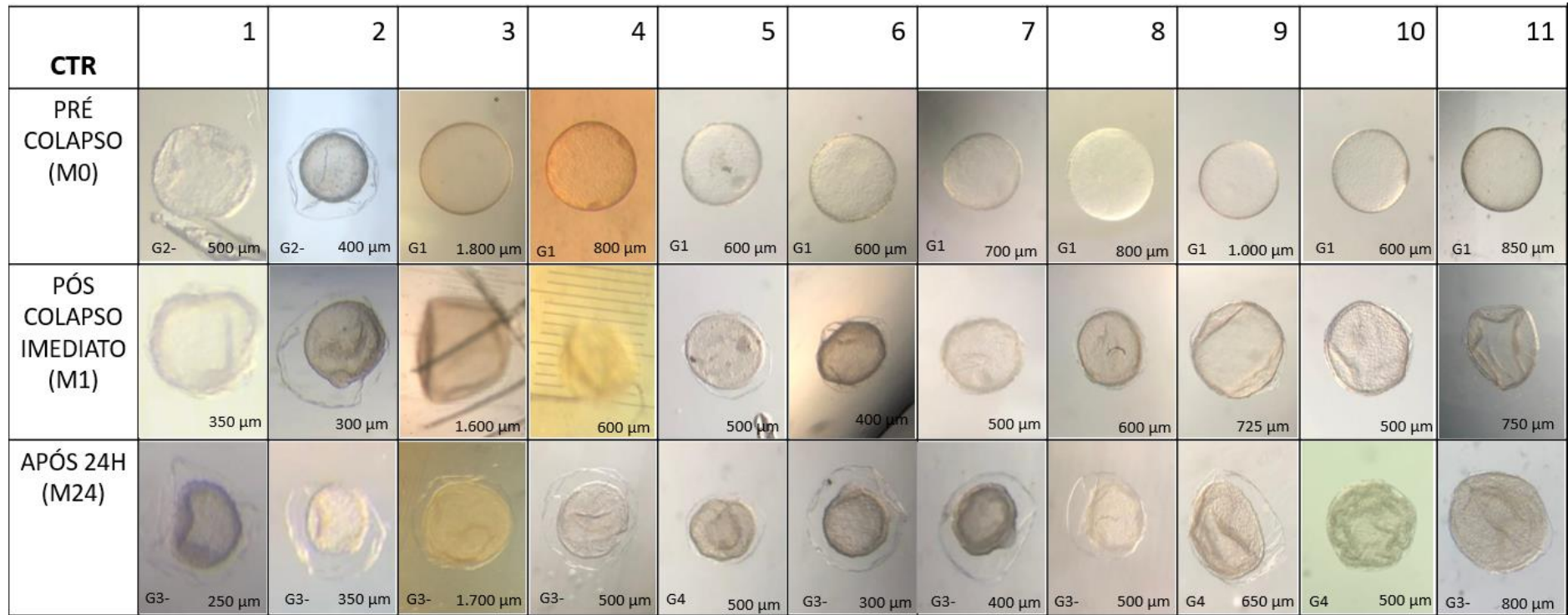


Figura 7. Embriões correspondente ao grupo colapsado acondicionado sob refrigeração a 5°C (CTR) nos três momentos: pré-colapso (M0), pós-colapso imediato (M1) e 24 horas após acondicionamento (M24), em suas respectivas classificações adaptada [32] e diâmetro (µm).

3.2. Sexagem embrionária

Um total de 11 das 19 amostras (57,90%) amplificadas foram diagnosticadas como machos, através da identificação da banda para TSPY, sendo sete resultados por PCR convencional e quatro por contraprova com uma segunda reação em sequência.

Entre as outras 8 amostras restantes, 2 (10,52%) apresentaram uma interpretação inconclusiva devido à amplificação de bandas inespecíficas. As 6 (31,57%) amostras restantes não apresentaram nenhum produto de amplificação para o TSPY, sendo consideradas sugestivas para amostras de fêmeas.

Vários testes com diferentes reações, termociclagem e gradiente de temperatura de anelamento foram feitos como tentativas de solucionar essa dificuldade encontrada na amplificação do material genético através da AMEL, mas não houve sucesso. Todos os testes de sexagens com amostras de FB para AMEL foram negativos, tanto na identificação de bandas para machos quanto para fêmeas.

3.3. Análises descritivas por microscopia de fluorescência e microscopia de contraste de interferência (DIC)

A avaliação por fluorescência e DIC de três embriões colapsados (Fig. 8) permitiu a observação da lesão causada pela agulha hipodérmica 26G no embrião, a cápsula embrionária e extrusão de blastômeros nos momentos imediatamente após o colapso (M1) e 24h após (M24) acondicionamento em temperatura ambiente (grupo CTA) e sob refrigeração a 5°C (grupo CTR).

A avaliação do embrião imediatamente após o colapso na imagem de fluorescência permitiu a visualização de lesões perfurantes causadas pela agulha que não foram possíveis ser vistas nas imagens do CTA e CTR no DIC.

O embrião acondicionado por 24h em temperatura ambiente apresentou pequena região de lesão perfurante na microscopia por fluorescência, mas não visível em DIC, e pequena extrusão de blastômeros é visível pelos dois métodos. O embrião submetido à refrigeração de 5°C por 24h apresentou também uma área de lesão perfurante visível e maior que a observada para o embrião mantido em temperatura ambiente. Além disso, o embrião acondicionado em temperatura ambiente por 24h após o colapso visualmente apresenta uma aparência melhor, com formato mais esférico e menores áreas alteradas.

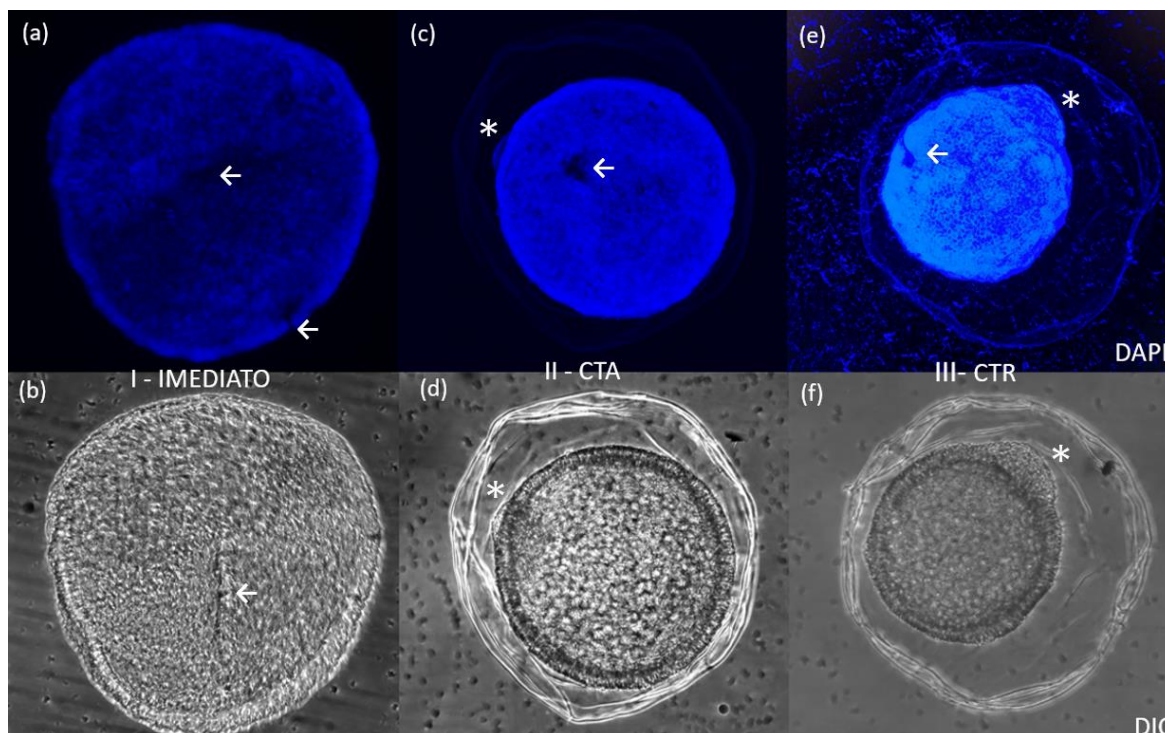


Figura 8. Imagens dos três embriões colapsados, colapsado e fixado imediatamente sem acondicionamento (a,b), colapsado e acondicionado em temperatura ambiente por 24h (c,d), e colapsado e acondicionado sob refrigeração a 5°C (e,f), em análises de fluorescência azul por marcador DAPI (a,c,e) e em microscopia de interferência de contraste (DIC) (b,d,f). (←) indica lesões perfurantes e (*) indica extrusão de blastômeros.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível realizar a sexagem de embriões produzidos *in vivo* através do FB, o que corrobora com estudos prévios [3,4,20]. É importante salientar que o FB não apenas contém DNA livre no FB de embriões equinos em quantidades suficientes para determinação do sexo por PCR, como também demonstrado por outros autores [3,4,20].

Dos embriões submetidos à PCR, 57,90% (11/19) foram diagnosticados com o sexo masculino através do gene TSPY, enquanto pelo gene amelogenina (AMEL), que distingue o sexo feminino do masculino, não foi possível a determinação do sexo de nenhuma amostra. Isso demonstra a maior facilidade de identificação do sexo masculino por meio da PCR convencional. Por isso, nos estudos de sexagem embrionária animal por PCR, o método de determinação por exclusão de resultados é utilizado principalmente para direcionamento de possíveis fêmeas [3], por ser o sexo mais difícil de ser diagnosticado [3,20].

A maior porcentagem de diagnóstico do sexo masculino pode ser explicada pelo uso da escolha do primer específico e pelo avanço no desenvolvimento embrionário. Em um primeiro estudo [3], três amostras que não resultaram em um produto de amplificação eram embriões fêmeas, no qual foram confirmados com um fragmento celular do embrião. Isso demonstra que os resultados para o primer específico do gene TSPY, localizado no

cromossomo Y, são mais facilmente detectados pois este é um gene presente em múltiplas cópias no genoma equino. Já a AMEL, localizada nos cromossomos X e Y, é um gene de cópia única e não é detectado de forma eficiente em amostras com pequenas quantidades de DNA, como o FB [3].

Por outro lado, relatou-se que em humanos a taxa de desenvolvimento do embrião tem correlação positiva com o sexo genético embrionário. Relataram que 72% (41/57) dos blastocistos com desenvolvimento mais avançados eram do sexo masculino e apenas 28% (16/57) eram do sexo feminino. Ainda, 60% dos embriões classificados com o desenvolvimento mais lento foram diagnosticados como sendo do sexo feminino e 40% para o sexo masculino [38].

Esses estudos nos fazem interpretar que os embriões em estágio de desenvolvimento avançado apresentem precocemente uma quantidade de DNA suficiente nas células, até mesmo no FB, facilitando a capacidade de amplificação para sexagem, e impactando na identificação do sexo masculino. Enquanto os embriões com o desenvolvimento mais lento, apresentem mais tardiamente o uma quantidade de DNA suficiente para amplificação. E associando à informação de que a AMEL é um gene de cópia única de difícil detecção em amostras com menor material genético [3], essa pode ser uma explicação da dificuldade de amplificação do DNA presente no FB para identificação de fêmeas através do primer AMEL.

Em relação aos dois resultados inconclusivos (10,52%), eles são denominados em outros estudos como falsos positivos nos diagnósticos por PCR, devido à amplificação inespecífica ou por contaminação de amostra [2,3,20,39]. Entretanto, a realização da segunda reação de PCR para contraprova auxiliou na obtenção de resultados mais fidedignos, pois é uma técnica molecular mais sensível e específica à amplificação do material genético [40,41,42]. Mesmo que só com a identificação de machos, essa contraprova trouxe uma maior clareza para diferirmos aquelas amostras que não apresentaram produto de amplificação, e que por método de exclusão foram sugestivas para fêmeas.

O único resultado positivo para AMEL obtido foi de uma amostra de células embrionárias com a identificação da dupla banda (160 a 240 bp) correspondente para macho, pode ser justificado pela maior quantidade e integridade do DNA presente nas células embrionárias que no FB [15]. Por isso também é comum os estudos realizarem uma contraprova dos resultados inconclusivos de sexagens com um fragmento celular do embrião [3], contraprova esta que no presente trabalho foi realizada por uma segunda reação de PCR em sequência.

O cultivo da amostra por 10 minutos a 95°C em banho seco e centrifugação antes da amplificação com o intuito de condensar o material genético permitiu uma melhor taxa de diagnóstico, 78,5% de amostras incubadas versus 45,5% de amostras não incubadas [2]. Apesar de a centrifugação feita estritamente sozinha não ter sido eficaz para condensar o DNA das amostras do presente trabalho, é válido que os futuros estudos com sexagem testem a incubação e centrifugação das amostras de FB, como descrito no estudo anterior [2], como tentativa de melhorar a amplificação para AMEL.

Além da sexagem pela origem e forma de coleta de amostras utilizadas neste estudo, a avaliação da capacidade de re-expansão e qualidade do embrião após incubação por 24h é outro ponto crucial para definir a viabilidade do uso da técnica. Ao compararmos alguns métodos de perfuração embrionária, diferentes tamanhos de lesão causadas pela perfuração são obtidas dependendo da técnica. A broca piezo drill promove perfuração de 15µm de diâmetro [16], a micropipeta de 25µm [2] e a agulha hipodérmica de 26G utilizada no presente projeto estima-se que a perfuração seja de 450µm de acordo com estudo de perfuração com agulhas hipodérmicas [43], ou seja, 18 vezes maior do que os diâmetros de lesão citados anteriormente.

É notável que a agulha hipodérmica causa uma lesão mais agressiva ao embrião do que os outros instrumentos de manipulação citados, e a força manual aplicada no momento da perfuração não é controlável como em um micromanipulador. Porém, a técnica aqui proposta é simples e menos custosa, o que permite sua realização na propriedade, sendo a avaliação de custo-benefício muito dependente então da resistência do embrião ao procedimento. E a implantação da técnica a campo desse método de sexagem pelo FB por colapso com agulha hipodérmica [20] pode ainda ser associada à vitrificação de embriões blastocistos (BI) expandidos grandes produzidos *in vivo* [19], ao invés da redução do diâmetro de BI com uso de micromanipulador [9,17,19].

A resistência dos embriões ao colapso foi avaliada pela qualidade morfológica após acondicionamento por 24h e pela análise descritiva da lesão por microscopia confocal de fluorescência e DIC. Devido às discrepâncias nos estudos sobre a melhor forma de acondicionamento para transporte de embriões [9,12,44], duas condições de temperatura foram avaliadas: temperatura ambiente e sob refrigeração a 5°C. Assim, grupos controles usando embriões íntegros também foram submetidos às mesmas condições para que fosse possível determinar o que é efeito da temperatura e o que é efeito do procedimento de colapso.

A capacidade de re-expansão e recuperação do embrião após as lesões causadas pela agulha na cápsula, nas células e quanto a perda de FB, são importantes fatores que denotam a qualidade embrionária após acondicionamento deles. Mas fatores externos podem interferir nesse processo, como o meio de manutenção [45], a temperatura [23,26] e o tempo de cultivo [3,17]. No presente trabalho foi observado que os embriões colapsados mantidos em temperatura ambiente ou sob refrigeração e em meio de manutenção por 24h apresentaram uma taxa de crescimento negativa, ou seja, apresentaram re-expansão parcial em sua maioria. A re-expansão dos embriões colapsados variou de 50% a 167% o que demonstra uma incrível capacidade de recuperação embrionária, principalmente quando acondicionado em temperatura ambiente. Não só pela sua capacidade de produção do FB mas também pelas melhores características morfológicas alcançadas pelos embriões colapsados e mantidos nas condições de temperatura ambiente.

Primeiramente, é fato que a cápsula embrionária tem grande importância no reconhecimento materno da gestação em equinos [46,47] por isso as preocupações com a mesma. Estudos já evidenciaram que os danos na cápsula em estágio de Bi podem ser reparados pelo útero [16,48], mas há uma hipótese de que uma cápsula mais madura de Bx, não tenha essa capacidade de recuperação e a perda de sua integridade possa ser fatal para o embrião [9].

Estudos mais atuais demonstram que após lesões capsulares com micromanipulador para aspiração do FB [3] ou até mesmo com a perfuração com agulha hipodérmica 26G para a vitrificação [19], uma porcentagem considerável desses embriões foi capaz de estabelecer gestação após esses danos, o que demonstra capacidade de se recuperarem de eventos nocivos à capsula embrionária já citada anteriormente [3,16,19,48].

As pesquisas demonstram que os B1 produzidos *in vivo* colapsados por micromanipulador podem retornar ao formato esférico parcialmente ou totalmente após algumas horas de cultivo *in vitro* [3,16,17]. Em um desses estudos, os embriões re-expandiram e mantiveram sua qualidade em um cultivo *in vitro* a 38°C e por 24h e com 72h eles já estavam em estágio de blastocisto eclodindo [17]. Em outro, o processo de re-expansão persistiu por 24h, 48h até 72 horas de cultivo a 38°C e sua viabilidade se manteve, aumentando em até 73,7% do seu tamanho inicial [3].

Além da importância de um meio adequado [45] para a capacidade de re-expansão, a temperatura ambiente tem uma influência direta na qualidade morfológica de embriões colapsados [49] Mesmo sofrendo uma lesão estimada 18 vezes maior do que em outros procedimentos já descritos [2,16], as análises descritivas feitas através da microscopia de

fluorescência demonstraram que o embrião colapsado acondicionado em temperatura ambiente apresentou uma boa capacidade de regeneração quando colocado em condições que permitam a manutenção do seu metabolismo, como meio de manutenção e temperatura ambiente.

Já a refrigeração é utilizada para reduzir o metabolismo celular e manter sua viabilidade [1,12], porém causa lesões [23,26] que podem ser cruciais para a qualidade embrionária. A refrigeração a 5°C é muito utilizada para o transporte do sêmen equino [50] que, mesmo com as lesões causadas pelo frio, foca no número de células móveis e íntegras para avaliar a capacidade de uma amostra de suportar o processo de refrigeração ou não, os chamados “good coolers” e “bad coolers” [51,52].

Porém, o mesmo pensamento não deve ser totalmente considerado para o embrião, porque por exemplo, se em uma amostra de sêmen houver 50% de células com lesões pela criopreservação, ainda assim há 50% de células viáveis com capacidade fertilizante semelhante à de espermatozoides frescos. Por outro lado, se um embrião apresentar as mesmas 50% de células lesionadas pela criopreservação tem-se o único embrião com metade da capacidade de desencadear uma gestação. E a avaliação morfológica do embrião é uma importante forma de prever a capacidade de estabelecimento de gestação [20,53,54].

Analisando o critério de qualidade, 54% dos embriões colapsados e submetidos ao acondicionamento em temperatura ambiente foram classificados como bons (36% G2+ e 18% G2-) após 24h, enquanto que 73% dos embriões acondicionados sob refrigeração a 5°C foram classificados em pobres. Assim, e levando em consideração os relatos sobre a sobrevivência e viabilidade de embriões após terem a blastocela aspirada por micromipulador e micropipeta e serem capazes de re-expandirem [3], e ainda com possibilidade de estabelecer uma gestação após a perfuração com agulha hipodérmica [19], somado às avaliações pós 24h de acondicionamento em temperatura ambiente, são boas as perspectivas de que esses embriões sejam capazes de desenvolverem uma gestação mesmo após a lesão embrionária causada pela perfuração com agulha hipodérmica 26G.

Portanto, comparando os dois tipos de transporte para os embriões colapsados, podemos considerar que mesmo com a redução de tamanho, o transporte em temperatura ambiente (25°C) teve um melhor efeito na capacidade de recuperação da qualidade morfológica dos embriões após as 24h da lesão causada pela agulha.

É necessário que novos estudos com um meio de manutenção mais nutritivo e um cultivo *in vitro* de maior período, quando possível em relação ao tempo de transporte, ou um cultivo em meio aquecido, principalmente em transportes mais curtos, assim como já foi

observado positivamente em literaturas de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) com embriões humanos [49] e equinos [36].

Nas análises descritivas feitas através da microscopia de fluorescência e DIC pelo microscópio confocal, as imagens de fluorescência, mesmo que ainda não tenha sido realizada a contagem de células totais e avaliação da viabilidade, o marcador de fluorescência DAPI foi essencial para a visualizar a lesão causada pela perfuração manual com agulha, além desse marcador já ter demonstrado viabilidade de uso para embriões da espécie equina [21,55,56,57].

Já as imagens do DIC não foram tão eficientes para visualização da lesão embrionária, mas foram úteis para observar o destacamento da cápsula, a delimitação das células da parede do trofoblasto com a massa celular interna (MCI) e extrusão de blastômeros, assim como já observado em outra literatura através de análises descritiva por fotomicrografia [16].

Existem ainda incertezas sobre qual técnica é menos invasiva em relação ao desenvolvimento embrionário e pós nascimento, se é a biopsia ou aspiração do FB. Contando que a aspiração do FB é uma linha de pesquisa mais recente, ainda nenhum estudo relatou efeitos negativos no desenvolvimento em bebês ou animais nascidos de uma produção *in vitro* após PGD por aspiração de FB. Contudo esse efeito negativo já foi relato com a biopsia de embriões humanos [58] e em experimentos com camundongos [14].

Ainda assim, mais pesquisas sobre o colapso embrionário com agulha hipodérmica devem ser feitas e os ajustes na técnica também, como por exemplo, utilização uma agulha de menor diâmetro, e também desenvolver um método de melhor estabilização do embrião na gota, podendo assim ter mais cautela na força manual exercida sob a agulha e embrião.

Sugere-se que para cessar algumas dessas incertezas sobre a sexagem através do FB coletado por colapso com agulha hipodérmica, o teste *in vivo* com a transferência desses embriões para primeiramente certificar a capacidade de implantação do embrião após essa lesão de 450µm, comprovar efetivamente a sexagem genética com a ultrassonografia e o nascimento do potro, e também avaliar em conjunto se o método por exclusão é eficaz para ser empregado quando se encontrar dificuldades para sexar fêmeas.

O transporte de embriões produzidos *in vivo* é muito utilizado nos programas de TE, porém os estudos que testaram as melhores condições disponíveis à campo são antigos [21,25,26,28,59,60,61], isso faz com que os médicos veterinários tomem decisões de como acondicionar os embriões por tempo ou temperatura de maneira empírica ou baseados em estudos muito antigos que não representam mais a realidade das condições disponíveis

atualmente no campo. Para esclarecer muitas dessas questões, embriões íntegros foram acondicionados sob temperatura ambiente e refrigeração a 5°C, assim como feito com os embriões colapsados, e simulando condições de transporte a campo.

Em relação ao crescimento embrionário, há uma hipótese na literatura de que a temperatura ambiente mantém o metabolismo do embrião até um certo momento, após este pode acontecer alterações metabólicas [12], porém esta hipótese não foi confirmada. Contudo no presente estudo, a taxa de crescimento dos embriões íntegros foi positiva (+ 25,95%) apenas para os embriões acondicionados em temperatura ambiente (NCTA), além destes embriões permanecerem em seu estágio de desenvolvimento, eles mantiveram e até mesmo melhoraram (10%) sua qualidade morfológica para grau 1 (excelente) após 24h. Esses são achados que indicam atividade metabólica do embrião e importantes para avaliar as condições de transporte [36].

Esses achados condizem com as literaturas sobre qualidade e tamanho de embriões íntegros, no qual um demonstrou que o armazenamento de embriões a 24°C mantém uma melhor qualidade embrionária do que os refrigerados a 5°C após 24h de armazenamento [23], e o outro demonstrou que as taxas de prenhez não diferem entre embriões com diâmetros de 300, 300 a 1000 ou >1000 mm quando biopsiados ou íntegros, e qualquer tamanho pode ser incluído em um programa de PGD sem afetar sua viabilidade e taxa de prenhez.

Sendo assim, podemos levantar em questão que a temperatura ambiente mantém o metabolismo do embrião íntegro por até 24h, sem apresentar efeitos prejudiciais morfológicamente visíveis ao embrião em relação ao seu crescimento durante o acondicionamento, como proposto por outros autores [12].

Embriões íntegros sob as mesmas condições de temperatura (32°C) e tempo (7-10h e 1-2 h) que os embriões biopsados transferidos a fresco, resultaram em taxas de prenhez similares, de 50% e 63%, respectivamente [2]. Considerando esses dados, é possível ter uma boa expectativa de resultados com a inovulação dos embriões íntegros acondicionados em temperatura ambiente avaliados no presente trabalho, uma vez que 90% dos foram classificados com grau 1 (excelente) após as 24h.

Por outro lado, a taxa de crescimento dos embriões íntegros refrigerados a 5°C foi negativa (-4,27%), e essa interrupção do crescimento embrionário nesse tipo de acondicionamento já foi descrita anteriormente [1,12,28]. Esta resposta à refrigeração está relacionada com a redução do metabolismo celular dos embriões que tem como objetivo a preservação da integridade até o momento da transferência [1,12], mas as chances de que a

qualidade desses embriões seja inferior nessas condições refrigeradas é muito maior do que os possíveis efeitos positivos de latência temporária [26].

Com o propósito de realizar uma avaliação mais criteriosa dos embriões colapsados, adaptamos a classificação morfológica de 1 a 5 de referência [32], e subdividimos os graus 2 e 3 em grau 2+, 2-, 3+ e 3-, devido à grande variação dentro de cada grau de classificação por consequência do colapso, mas aplicamos essa classificação para todos os embriões. Sendo assim, com essa adaptação se espera apurar os futuros dados quando avaliado as taxas de prenhez e perdas embrionárias relacionadas com o grau de qualidade morfológica do embrião.

O presente estudo evidenciou redução da qualidade morfológica dos embriões íntegros refrigerados a 5°C, com uma queda de 20% de embriões grau 1 para classificação de grau 4 (degenerados) após as 24h de acondicionamento. Concordando com outros autores, que também relataram que a refrigeração a 5°C por até 24h leva a alterações morfológicas e até à redução da sobrevivência de embriões menores [23,26,35,60].

Apesar dos efeitos negativos, um dos poucos estudos recentes apresentaram uma boa taxa de prenhez com a refrigeração dos embriões antecedendo a vitrificação [44] e após a biopsia embrionária para PGD [12]. Foi obtido as seguintes taxas de prenhez, 55,5% e 75% a 12°C por 12h e 24h, respectivamente [44], e 72,4% entre 15 a 18°C por 30 minutos [12]. No entanto, mas vale salientar que foi um curto período de acondicionamento nesse último transporte em que os embriões foram submetidos à refrigeração.

Sabe-se que apenas a avaliação da qualidade morfológica [32] não traz todas as informações suficientes para confirmar a viabilidade embrionária. Apesar disso, essa avaliação ainda é a única forma mais aplicável na rotina do campo. Por isso, vários estudos demonstram a relação do grau de classificação da qualidade morfológica com suas respectivas taxas de prenhez [25,27,31,60]. O achado mais relatado, são que os embriões classificados em grau 3 (pobre) e grau 4 (degenerado) apresentam taxas de prenhez inferiores a aqueles classificados como grau 1 (excelente) e grau 2 (bom) [25,27,31] seguindo a classificação de 1 a 5 de referência [32].

Um desses estudos, apresentou a taxa de prenhez relacionada com o grau de qualidade embrionária em dois momentos da gestação, 12 dias e 50 dias, ou seja, avaliando também as chances de perda embrionária em relação a classificação morfológica. Respectivamente, encontraram as seguintes taxas aos 12º e 50º dias, para embriões grau 1 (excelente) de 68,5% e 60,1%, grau 2 (bom) de 65,1% e 48,4%; e grau 3/4 (razoável/pobre)

de 40,4% e 29, 8% [27]. As chances de perdas embrionárias aumentam decrescentemente a partir do 50º dia de gestação.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que é possível realizar a sexagem embriões equinos através de amostras do FB por PCR, coletadas a partir da perfuração manual do embrião com agulha hipodérmica 26G. Os embriões colapsados com agulha hipodérmica 26G apresentam capacidade de re-expansão parcial das lesões causadas em 24h de acondicionamento, sendo a incubação em meio de manutenção à temperatura ambiente melhor que à temperatura de 5°C. E consideramos também, que a temperatura ambiente (25°C) demonstrou ser o melhor tipo de acondicionamento para o transporte de embriões equinos íntegros e colapsados, por atuar mantendo ou melhorando a qualidade morfológica dos embriões durante as 24 horas. Estudos complementares são necessários para comprovar a viabilidade das células embrionárias pós-colapso com testes *in vitro*, e a aplicabilidade de inovulação desses embriões para obtenção de suas possíveis taxas de prenhez e perdas embrionárias como teste *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001). Agradecemos a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) em especial a área de Reprodução Animal, CERBEQ-FMVZ, o Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), o Laboratório de Biologia Molecular de Clínicas Veterinária (LBMCV) e a todos os colaboradores por essa oportunidade de desenvolver a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] McCue PM, DeLuca CA, Wall JJ. Cooled-transported embryo technology. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (eds). Equine Reproduction, 2nd ed. Ames, IA: Wiley Blackwell, 2011; 2880–6. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113059253>
- [2] Herrera C, Morikawa MI, Bello MB, Von Meyeren M, Centeno JE, Dufourq P, Martinez MM, Llorente J. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. Theriogenology, 2014; 81:758-763. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.013>.
- [3] Herrera C, Morikawa MI, Castex CB, Pinto MR, Ortega N, Fanti T, Garaguso R, Franco M J, Castañares M, Castañeira C, Losinno L, Miragaya MH, Mutto A. Blastocle fluid from *in vitro* and *in vivo* produced equine embryos contains nuclear

- DNA. *Theriogenology*, 2015; 83:415420. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.006>.
- [4] Herrera C, Morikawa MI, Bello MB, Von Meyeren M, Eusebio JC, Dufourq P, Martinez MM, Llorente J. Blastocoele Fluid vs. Embryonic Cells for Sex Determination in Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2018;66:197. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.087
- [5] Squires EL, Mccue PM, Vanderwall DK. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 1999;51: 91-104. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00234-9).
- [6] Squires EL. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020;89:102981. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102981>.
- [7] Chen HF, Chen SU, Ma GC, Hsieh ST, Tsai H D, Yang YS, Chen M. Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future challenges. *Journal of the Formosan Medical Association*, 117(2), 2017;94-100. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.08.006>
- [8] Maggiulli R, Giancani A, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Human blastocyst biopsy and vitrification. *Journal of Visualized Experiments*, 2019;149:e59625. doi:10.3791/59625
- [9] Hinrichs K, Choi YH. Equine embryo biopsy, genetic testing, and cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32:390-396. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.005>.
- [10] Choi YH, Penedo MCT, Daftari P, Velez IC, Hinrichs, K. Accuracy of preimplantation genetic diagnosis in equine in vivo-recovered and in vitro-produced blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*, 2015;28:1382-1389. doi:10.1071/rd14419
- [11] Herrera C. Clinical applications of preimplantation genetic testing in equine, bovine, and human embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2016;41:29-34. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.002>.
- [12] Riera FL, Roldán JE, Espinosa JM, Fernandez JE, Ortiz I, Hinrichs K. Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019;31:1917-1925. <https://doi.org/10.1071/RD19228>.
- [13] Scott Jr RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinic trial. *Fertility and sterility* 2013; 100:624-630. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.039>.
- [14] Wu Y, Lv Z, Yang Y, Dong G, Yu Y, Cui Y, Sha J. Blastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice. *Cellular and molecular life sciences* 2014; 71:1761-1774. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1466-2>
- [15] Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, Bianchi M, Willes D, Magnani M, Bulletti C. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive biomedicine online*, 2013, 26.6:603-610. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.012>.
- [16] Choi YH, Gustafson-Seabury A, Velez IC, Hartman DL, Bliss S, Riera FL, Roldán JE, Chowdhry B, Hinrichs K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Animal Reproduction Science*, 2010;140:893-902. DOI: 10.1530/REP-10-0141

- [17] Choi YH, Velez IC, Riera FL, Roldán JE, Hartman DL, Bliss SB, Blanchard TL, Hayden SS, Hinrichs K. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, 2011 ;76:143–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.028>.
- [18] Choi YH, Hinrichs, K. Vitrification of in vitro -produced and in vivo -recovered equine blastocysts in a clinical program. *Theriogenology*, 2016;87:48–54. [doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.047](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.047).
- [19] Ferris RA, Mccue PM, Trundell DA, Morrissey JK, Barfield JP. Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2016; 100:64-65. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.047>.
- [20] Andrade ERF, Barros LD, Ignácio FS. Sexagem embrionária *in-vivo* em equinos por microaspiração do líquido da blastocoele seguida por reação da cadeia em polimerase (PCR). Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2017.
- [21] Moussa M, Duchamp G, Dael PF, Bruyas JF. Effect of embryo age on the viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2006;26.11:529-534. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.09.009>.
- [22] Moya-Araujo CF, Araujo GHM, Meira C. Avanços na criopreservação de embriões equinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2010:58-66. <http://www.cbra.org.br/portal/publicacoes/rbra/2010/rbrajm2010.html>.
- [23] Clark KE, Squires EL, Mckinnon AO, Seidel GEJR. Viability of stored equine embryos. *Journal of Animal Science*, 1987;65:534-542. <https://doi.org/10.2527/jas1987.652534x>.
- [24] Cook VM, Squires EL, Mckinnon AO, Bailey J, Long PL. Pregnancy rates of cooled, transported equine embryos. *Equine Veterinary Journal*, 1989;21:80-81. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04684.x>
- [25] Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel GEJR, Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*, 1991;36:23-32. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90430-L](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90430-L).
- [26] Carnevale EM, Squires EL, Mckinnon AO. Comparison of Ham's F10 com CO2 ou Hepes buffer para armazenamento de embriões equinos a 5 C por 24 H. *Journal of animal Science*, 1987;65:1775-1781. <https://doi.org/10.2527/jas1987.6561775x>.
- [27] Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, Mccue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, 2000;54: 965-79. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00405-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00405-2).
- [28] Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Dael PF. In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology* , 2003;59:1615-1625. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01210-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01210-4).
- [29] Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. E. Horse embryo diameter is influenced by the embryonic age but not by the type of semen used to inseminate donor mares. *Theriogenology* 2018; 115:90-93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.023>.
- [30] Mccue PM, Ultrasound Evaluation of the Non-Pregnant Mare. In J. Dascanio, & P. McCue, *Equine Reproductive Procedures*. Iowa, EUA: Wiley Blackwell, 2014:26-31. <https://doi.org/10.1002/9781118904398.ch8>
- [31] Mckinnon AO, Squires EL. Equine embryo transfer. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 1988a;4:305-333. [doi: 10.1016/s0749-0739\(17\)30643-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30643-0).
- [32] Mckinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988b; 192:401-406. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30643-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0)

- [33] Hasegawa T, Sato F, Ishida N, Fukushima Y, Mukoyama H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *Journal Veterinary Medicine Science*, 2000; 62:62-1109. DOI: 10.1292/jvms.62.1109
- [34] Paria N, Raudsepp T, Pearks Wilkerson AJ, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Love CC, Chowdhary BP. A gene catalogue of the euchromatic male-specific region of the horse Y chromosome: comparison with human and other mammals. *PLoS One*, 2011; 6:21374. DOI: 10.1371/journal.pone.0021374
- [35] Moussa M, Tremoleda JL, Duchamp G, Bruyas JF, Colenbrander B, Bevers MM, Dael PF. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C. *Theriogenology*, 2004; 6:921-932. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00280-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00280-2).
- [36] Canesin HS, Ortiz I, Rocha Filho AN, Salgado RM, Brom-de-luna JG, Hinrichs K. Effect of warming method on embryo quality in a simplified equine embryo vitrification system. *Theriogenology*, 2020; 151:151-158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.012>.
- [37] Sandell L, Inman K, Trainor P. DAPI staining of whole-mount mouse embryos or fetal organs. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018:10. doi:10.1101/pdb.prot094029
- [38] Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, William B. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Dagan Wells D, Path FRC. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertility and Sterility*, 2011;95-2. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.04.003.
- [39] Hasler JF, Cardey E, Stokes JE, Bredbacka P. Nonelectrophoretic PCR sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, 2002; 58:1457-69. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01044-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01044-0)
- [40] Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:118-44. doi: 10.1093/nar/16.24.11844.
- [41] Wilczynski SP. *Molecular Biology*. In: *The Surgical Pathology Laboratory*, cap 7. p. 89, 2009.
- [42] Grody WW, Nakamura RM, Strom CM, Kiechle FL. *Molecular diagnostics: techniques and applications for the clinical laboratory*. 1th ed. Oxford:UK, 2009.
- [43] Cavassa S. Estudos sobre agulhas hipodérmicas: variação do esforço de penetração em um tecido artificial, 2017. https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/151641/cavassana_s_me_ilha.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- [44] Diaz FA, Gutierrez E. J, Cramer E, Paccamonti DL, Gentry GT, Bondioli KR. Pregnancy rates following low-temperature storage of large equine embryos before vitrification. *Journal of equine veterinary science*, 2018; 64:12-16. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.01.009>.
- [45] Gomes LPM, Gavioli D, Jacob JF, Crespilho AM, Cardoso CE, Gomes GM. Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós-transferência de embriões. *Revista Saúde*, 2014; 5:23-27. <https://www.researchgate.net/publication/305853974>.
- [46] Betteridge K. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Vet J* 1989; 21:92-100. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04690.x>
- [47] Ginther OJ. Equine embryo mobility. A friend of theriogenologists. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2021;106:103747. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103747>
- [48] Skidmore J, Boyle MS, Cran D, Allen WR. Micromanipulação de embriões equinos para produzir gêmeos monozigóticos. *Equine Veterinary Journal*, 1989;21:126-128.

<https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04696.x>

- [49] Kovačić B, Taborin M, Vlasisavljević V. Response: Artificial blastocoel collapse of human blastocysts before vitrification and its effect on re-expansion after warming. *Reproductive BioMedicine Online*, 2018;36:628–629. doi:10.1016/j.rbmo.2018.03.003
- [50] Papa FO. *Reprodução de Garanhões*. 1ed. 9:125-143, 2020.
- [51] Carneiro JAM, Canisso IF, Bandeira RS, Scheeren VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Dell'Aqua JA. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal Reproduction Science*, 2018;192:107–118. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.02.020
- [52] Campos GA, Garcia VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Segabinazzi LGTM, Maciel LFS, Alvarenga MA, Dell'Aqua JA. Sodium Caseinate and Cholesterol Improve Bad Cooler Stallion Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020;93:103201. doi:10.1016/j.jevs.2020.103201
- [53] Vanderwall DK. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 1996;12:61-83. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30295-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30295-X).
- [54] Mccue PM, Deluca CA, Ferris RA, WALL JJ. How to evaluate equine embryos. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, Las Vegas, 2009*; 55:252-255. <https://aaep.org/sites/default/files/issues/proceedings-09proceedings-z9100109000252.pdf>
- [55] Tremoleda JL, Van Haefen T, Stout TA, Colenbrander B, Bevers MM. Cytoskeleton and chromatin reorganization in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection: patterns associated with normal and defective fertilization. *Biology of reproduction*, 2003;69:186-194.
- [56] Huhtinen M, Bredbacka P, Kotilainen T. Nonsurgical Transfer of 4', 6'-Diamidino-2-Phenylindole-Stained Equine Demi-Embryos Treated with Cytochalasin B and Nocodazole. *Biology of Reproduction*, 1995; 52:325-328. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.325
- [57] Huhtinen M, Peippo J, Bredbacka P. Transferência bem-sucedida de embriões equinos biopsiados. *Theriogenology*, 1997, 48:361-367.
- [58] Middelburg KJ, Heineman MJ, Haadsma ML, Bos AF, Kok JH, Hadders-Algra M. Neurological condition of infants born after in vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *Pediatric research* 2010; 67:430-434. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d2273e>.
- [59] Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Dael PF. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and emcare holding solutions. *Theriogenology*, 2002;58:755-757. <http://hdl.handle.net/1854/LU-8668626>.
- [60] Clark KE, Squires EL, Mckinnon AO, Seidel GEJR. Viability of stored equine embryos. *Journal of Animal Science*, 1987; 65:534-542. <https://doi.org/10.2527/jas1987.652534x>.
- [61] Squires EL, Mccue PM, Vanderwall DK. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 1999; 51:91-104. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00234-9).