

EFEITO DA MICROSSECÇÃO DE EMBRIÕES EQUINOS NA TAXA DE PREENHEZ APÓS A VITRIFICAÇÃO

JÉSSICA LAZZARI¹; ANDREZ PASTORELLO BOHN²;
ARNALDO DINIZ VIEIRA³, RAFAEL GIANELLA MONDADORI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – jelazzari@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andrezbohn@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vieira_ad@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões equinos é uma das biotecnologias reprodutivas empregada na propagação de material genético de éguas (ARAUJO et al., 2010). Normalmente a coleta dos embriões (mórula ou blastocisto inicial) ocorre a partir do dia 6 pós ovulação, logo após sua chegada no útero, que geralmente ocorre entre 5,5 a 6 dias pós ovulação. Normalmente o embrião, no momento da coleta, mede < 300 µm de diâmetro (CAIXETA et al., 2008). Considerando o exposto, normalmente a taxa de recuperação de embriões é de aproximadamente 50%, devido ao possível atraso no deslocamento do embrião pelo oviduto (BATTUT et al., 1997).

Contudo, para maior facilidade de difusão e possibilidade de comércio internacional de embriões é necessária a associação de um método de criopreservação que atue mantendo a integridade do embrião por meio da redução de seu metabolismo e divisão celular (ARAUJO et al., 2010). Atualmente, a vitrificação, devido a rapidez e baixo custo tem sido a técnica de eleição para criopreservar embriões equinos. A técnica consiste na solidificação da água do embrião, evitando a formação de cristais de gelo, ficando a água em estágio amorfo. Para isso é necessário o uso de altas doses de crioprotetores, levando a redução do volume de líquido intracelular (ARAUJO et al., 2010).

Quanto maior o intervalo ovulação-coleta, maior será o embrião (BATTUT et al., 1997) e mais alta a taxa de recuperação embrionária (ARAUJO et al., 2010), porém a taxa de sucesso na criopreservação dessas estruturas é menor. HENDRIKS et al. (2015) concluíram que embriões equinos grandes (diâmetro > 300 µm) apresentam mais danos celulares ocasionados pelos cristais de gelo se comparados aos embriões pequenos (diâmetro < 300 µm). Aparentemente, a cápsula, que se forma em aproximadamente 12 horas após a entrada do embrião no útero (CAIXETA et al., 2008), é responsável pela baixa taxa de sucesso. Essa estrutura glicoproteica de baixa permeabilidade praticamente impossibilita processos de criopreservação (ARAUJO et al., 2010).

Dessa forma, a fim de facilitar e permitir a troca com o crioprotetor, HENDRIKS et al. (2015) e SANCHEZ et al. (2017) indicam a vitrificação de embriões grandes, precedida de perfuração na cápsula e colapso da blastocel. Assim, baseado nessas premissas e buscando maior autonomia à campo, o trabalho teve por objetivo avaliar a taxa de prenhez de embriões grandes cuja cápsula foi submetida a microssecção pré vitrificação.

2. METODOLOGIA

Dez éguas adultas, sem raça definida, foram incluídas como doadoras de embriões. Após avaliação ginecológica completa, iniciou-se o monitoramento do ciclo estral. A obtenção dos embriões foi realizada conforme descrito por DE

ALMEIDA SILVA et al. (2016), sendo a deslorelina ou a gonadotrofina coriônica humana os indutores de ovulação. O momento da ovulação foi considerado dia zero (D0).

Passados oito dias da ovulação (D8), a lavagem uterina foi realizada via transcervical em sistema fechado (SCOTT et al., 2012). Os embriões recuperados foram submetidos a classificação morfológica quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade (MCKINNON E SQUIRES, 1988) e tiveram seu diâmetro mensurado utilizando uma lente ocular graduada.

Aleatoriamente, 22 embriões foram distribuídos em: Grupo MP (micropunção e vitrificação) (n=4); Grupo MS (microsecção e vitrificação) (n=6); Grupo AF (transferido a fresco) (n=4); e Grupo SA (vitrificação sem manipulação prévia) (n=8).

Os embriões do grupo MP foram submetidos a perfuração da cápsula e blastocèle com uma agulha 30 G (Disposable dental needle, DentBras). Os embriões do grupo MS sofreram uma incisão da cápsula por uma micro lâmina confeccionada a partir de uma lâmina de barbear (BREDBACKA et al., 1995; modificado).

Os embriões dos grupos MP, MS e SA foram vitrificados segundo metodologia de SANCHEZ et al., (2017), com modificações. Inicialmente, o embrião foi exposto a solução de estabilização (SE: 10% DMSO + 10% EG + 0,25M SAC) a 39° C por de três minutos. Em seguida, o embrião foi transferido para solução de vitrificação (SV: 20% DMSO + 10% EG + 0,25M SAC). O embrião foi acondicionado em 2 µL de SV em uma palheta de 0,25 mL cortada ao meio (*hemi-straw* HS) e imerso no nitrogênio líquido dentro de um período de 30 segundos. Cada HS contendo um embrião foi acondicionada em uma palheta de 0,5 mL previamente identificada para armazenamento em botijão criogênico até o momento de seu aquecimento.

De acordo com a disponibilidade de receptoras, os embriões foram aquecidos e inovulados, para se determinar a viabilidade de cada embrião. As éguas receptoras tiveram o ciclo estral e desenvolvimento folicular monitorado por ultrassonografia transretal para determinação do momento da ovulação (dia zero = D0). No D5, após reavaliação da receptora para confirmar as características do corpo lúteo, tônus e ausência de sinais de edema uterino, um embrião foi escolhido para aquecimento (grupos alternados).

Para o aquecimento, a HS contendo o embrião foi exposta ao ar por 10 segundos e em seguida imersa em solução de aquecimento 1 (SA1: TC199 + SFB + 0,5M SAC) e mantida a 39°C. Após cinco minutos de exposição, o embrião foi transferido para SA2 (TCM199 + SFB + 0,25M SAC), onde permaneceu por cinco minutos antes de passar para o meio TCM199 + SFB. Após esse período de reexpansão in vitro, o embrião foi colocado em uma palheta da 0,5 ml que foi carregada em uma pipeta de inovulação (Minitube, Verona, WI). A inovulação foi realizada via transcervical com a pipeta coberta com uma bainha estéril e a mesma coberta por uma camisa sanitária estéril, sendo o embrião depositado no corpo do útero.

Por fim, o estado gestacional foi determinado entre 16 e 25 dias pós-ovulação por ultrassonografia transretal e os resultados submetidos à análise estatística por chi-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de prenhez obtidas no presente experimento estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Taxa de prenhez de embriões submetidos ou não a micromanipulação ou a criopreservação

	Grupos			
	MP	MS	SA	AF
Tamanho médio dos embriões (μm)	756	940	528	360
Taxa de prenhez aos 16 dias de gestação (%)	20	33	60	75
Taxa de prenhez aos 25 dias de gestação (%)	0	0	33,3	75

Abreviaturas: MP – Micropunção e vitrificação; MS – Microsecção e vitrificação; SA – Vitrificação sem ablação; AF – À fresco.

Como pode ser observado, em todos os tratamentos que envolveram a manipulação prévia dos embriões, a taxa de prenhez aos 25 dias foi nula. Em equinos, a sinalização da gestação ocorre pela migração do concepto pelo útero, e a cápsula atua mantendo a forma do embrião e permitindo a sua mobilidade. Além disso, confere proteção física e biológica, contra as contrações miométriais, e agentes patogênicos e do sistema imunológico materno, respectivamente. (CAIXETA et al., 2008).

A completa retirada da cápsula ou o enfraquecimento da mesma ao ponto de induzir sua perda afeta a capacidade de estabelecimento da gestação (STOUT et al., 2005). No mesmo estudo, como os conceptos não foram visualizados aos 10 - 12 dias após a ovulação, os autores atribuem a uma possível perda embrionária antes do período de sinalização da gestação (16º dia de gestação). Isso porque, desprovido da cápsula, o embrião sofreu a ação mecânica do miométrio, culminando na sua degeneração (STOUT et al., 2005).

A taxa de prenhez nula obtida no grupo MP, pode ser atribuída a que apenas a punção não é suficiente para ablação efetiva da blastocela em embriões grandes. Isso porque, WILSHER et al. (2019) avaliaram os efeitos da punção isolada ou associada a aspiração de 90% ou mais da blastocela, em embriões de diferentes tamanhos, e concluíram que para embriões $\leq 550 \mu\text{m}$ não houve diferença na taxa de prenhez entre os grupos. Contudo, para embriões $> 550 \mu\text{m}$, onde se enquadravam os embriões do presente estudo, a taxa de prenhez para o grupo puncionado e aspirado foi de 72%, enquanto que para o somente puncionado foi de 10%. Apesar de no presente estudo não haver diferença significativa entre os grupos quanto ao tamanho dos embriões, nota-se que nos grupos MS e MP o tamanho dos embriões é superior a $550 \mu\text{m}$, o que poderia justificar os baixos índices de prenhez, mesmo este sendo maior do que o encontrado pelo autor (10%).

4. CONCLUSÕES

As metodologias testadas não foram eficientes para melhorar a viabilidade de embriões equinos grandes após a criopreservação. Dessa forma, é necessário desenvolver novos estudos associados com outras formas de diminuir o volume embrionário minimizando os danos a cápsula.

5. REFERÊNCIAS

- ARAUJO, C. F. M., ARAÚJO, G. H. M., MEIRA, C. D. Avancos na criopreservação de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 58-66, 2010.
- BATTUT, I., COLCHEN, S., FIENI, F., TAINTURIER, D., BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal**, Paris, v. 29, n. 25, p. 60-62, 1997.
- BREDBACKA, P., KANKAANPÄÄ, A., PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. **Theriogenology**, Jokioinen, v. 44, n. 2, p. 167-176, 1995.
- CAIXETA, E. S., FAGUNDES, N. S., CAIXETA, M. S., PYLES, E. S. S. Early equine embryonic development—a review. **Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Brasília, v. 103, p. 25-34, 2008.
- DE ALMEIDA SILVA, P. C., OLIVEIRA, J. P., PAIVA, S. O., CARAM, D. F., DE CASTRO JUNQUEIRA, R. G., JACOB, J. C. F., SÁ, M. A. F. Comparação entre dois agentes indutores da ovulação em éguas. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, Seropédica v. 38, n. 2, p. 45-48, 2016.
- HENDRIKS, W. K., ROELEN, B. A. J., COLENBRANDER, B., STOUT, T. A. E. Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants or cryopreservation by slow-freezing or vitrification. **Equine Veterinary Journal**, Boxmeer, v. 47, n. 6, p. 701-707, 2015.
- MCKINNON, A. O. Morphologic assessment of the equine embryo. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 192, p. 401-406, 1988.
- SANCHEZ, R., M. BLANCO, J. WEISS, I. ROSATI, C. HERRERA, H. BOLLWEIN, D. BURGER, H. SIEME. 2017. Influence of embryonic size and manipulation on pregnancy rates of mares after transfer of cryopreserved equine embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, Hanover, v. 49, p. 54-59, 2017.
- SCOTT, B. R., CARWELL, D. B., HILL, R. A., BONDIOLI, K. R., GODKE, R. A., GENTRY, G. T. Evaluation of capsule permeability in the equine blastocyst. **Journal of Equine Veterinary Science**, Baton Rouge, v. 32, n. 12, p. 795-798, 2012.
- 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**, Newmarket, v. 87, n. 3-4, p. 269-281, 2005.
- WILSHER, S., RIGALI, F., COUTO, G., CAMARGO, S., ALLEN, W. R. Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoel fluid. **Equine veterinary journal**, Sharjah, v. 51, n. 4, p. 500-505, 2019.