

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Técnica de colapamento manual da blastocle de embriões equinos e uso de progesterona injetável na manipulação do ciclo estral de bovinos e ovinos**

**Andrez Pastorello Bohn**

Pelotas, 2021

**Andrez Pastorello Bohn**

**Técnica de colabamento manual da blastocle de embriões equinos e uso de progesterona injetável na manipulação do ciclo estral de bovinos e ovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Rafael Gianella Mondadori

Coorientador: Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B677t Bohn, Andrez Pastorello

Técnica de colabamento manual da blastocele de embriões equinos e uso de progesterona injetável na manipulação do ciclo estral de bovinos e ovinos / Andrez Pastorello Bohn ; Rafael Gianella Mondadori, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2021.

51 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Criopreservação. 2. Microsecção. 3. Blastocele. 4. Ruminantes. I. Mondadori, Rafael Gianella, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.2089

Andrez Pastorello Bohn

Técnica de colabamento manual da blastocele de embriões equinos e uso de progesterona injetável na manipulação do ciclo estral de bovinos e ovinos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/03/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori (Orientador)  
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade de Minnesota - EUA

Prof. Dr. Ilusca Sampaio Finger  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fernando Caetano de Oliveira  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

## Resumo

BOHN, Andrez Pastorello. **Técnica de colabamento manual da blastocele de embriões equinos e uso de progesterona injetável na manipulação do ciclo estral de bovinos e ovinos.** 2021. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O desenvolvimento de estratégias de baixo custo para facilitar a preservação de germoplasma, bem como antecipar o início da atividade reprodutiva das fêmeas, é fundamental para aumentar a eficiência dos rebanhos. Com isso, essa dissertação teve como objetivos: (1) revisar os métodos e suportes utilizados para criopreservação de embriões equinos; (2) determinar a viabilidade de uma técnica manual de microsecção embrionária para redução da blastocele de embriões equinos visando melhorar sua criotolerância a vitrificação; (3) determinar a influência da aplicação de progesterona injetável (iP4) em novilhas *Bos taurus* antes de um programa de inseminação por tempo fixo (IATF); e (4) determinar a viabilidade do uso da iP4 na indução e sincronização de estro em ovelhas fora da estação reprodutiva. No artigo 1, revisão publicada sobre os métodos e suportes para criopreservação ficou clara a necessidade de avançar no conhecimento sobre como criopreservar embriões de grande diâmetro e as alternativas para redução do volume da blastocele. No artigo 2, submetido a publicação, as técnicas simplificadas propostas não melhoraram a criotolerância dos embriões equinos micromanipulados. A hipótese é que o dano a cápsula tenha sido excessivo. Nos capítulos seguintes, foi testada a viabilidade do uso de iP4 em novilhas destinadas a IATF, não sendo identificado estímulo de antecipação de puberdade ou aumento nas taxas de prenhez. Em ovinos fora da estação reprodutiva, a aplicação de iP4 afetou a taxa de manifestação de estro e de prenhez. Os resultados obtidos com as técnicas de micromanipulação de embriões equinos e de aplicação de iP4 em novilhas e ovelhas fora da estação, não foram satisfatórios, caracterizando que seu uso não é recomendável até que novos estudos sejam realizados.

**Palavras-chave:** criopreservação; microsecção; blastocele; ruminantes; puberdade.

## Abstract

BOHN, Andrez Pastorello. **Manual blastocoel collapse technique in equine embryos prior to vitrification and use of injectable long-acting progesterone in cattle and sheep.** 2021. 51f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

The development of low-cost strategies to facilitate the preservation of germplasm, as well as to anticipate the beginning of the reproductive activity of females, is essential to increase the efficiency of herds. Considering this statement, this dissertation had as objectives: (1) to review the methods and supports used for cryopreservation of equine embryos; (2) to determine the feasibility of a manual embryonic microsection technique to reduce the blastocoel of equine embryos in order to improve their cryotolerance to vitrification; (3) to determine the influence of the application of injectable progesterone (iP4) on *Bos taurus* heifers before a fixed-time artificial insemination (FTAI); and (4) determine the feasibility of using iP4 to induce and synchronize estrus in ewes during an anestrus season. In the published review on methods and supports for cryopreservation, became clear the need to advance knowledge on how to cryopreserve large-diameter embryos and study alternatives for reducing the volume of the blastocoel. In article 2, submitted for publication, the proposed simplified techniques did not improve the cryotolerance of micromanipulated equine embryos. The hypothesis is that the damage to the embryo capsule has been excessive. In the following chapters, the feasibility of using iP4 in heifers previous to FTAI protocol was tested, not influencing on the anticipation of puberty or pregnancy rates. In ewes during anestrus season, the use of iP4 affected the rate of estrus and pregnancy. The results obtained with the micromanipulation techniques of equine embryos and application of iP4 in heifers and ewes, were not satisfactory, being evident that its use is not recommended until further studies are carried out.

**Keywords:** cryopreservation; microsection; blastocoel; ruminants; puberty

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Desempenho reprodutivo de novilhas submetidas a protocolo de indução de puberdade, IA e IATF subsequente durante estação reprodutiva.....	34
Tabela 2	Desempenho reprodutivo de ovelhas submetidas a protocolo de indução de ciclicidade durante anestro sazonal com dispositivo intravaginal impregnado com 60 mg de MAP ou injeção de progesterona de longa duração (iP4).....	38

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	7
<b>2 Artigos</b> .....	9
<b>2.1 Artigo 1</b> .....	9
<b>2.2 Artigo 2</b> .....	16
<b>3 Experimentos</b> .....	28
<b>3.1 Experimento 1</b> .....	28
<b>3.1.1 Introdução</b> .....	28
<b>3.1.2 Metodologia</b> .....	29
<b>3.1.3 Resultados e discussão</b> .....	31
<b>3.1.4 Conclusão</b> .....	33
<b>3.2 Experimento 2</b> .....	34
<b>3.2.1 Introdução</b> .....	34
<b>3.2.2 Metodologia</b> .....	35
<b>3.2.3 Resultados e discussão</b> .....	36
<b>3.2.4 Conclusão</b> .....	37
<b>4 Considerações finais</b> .....	38
<b>Referências</b> .....	39
<b>Anexos</b> .....	21

## 1 Introdução

O agronegócio brasileiro tem sido um dos maiores responsáveis pelo crescimento econômico do país. Em 2019, a soma do setor chegou a R\$ 1,55 trilhão, equivalente a 21,4% do PIB brasileiro (CEPEA/USP). O Brasil possui o maior rebanho de equinos e bovinos da América Latina, sendo quarto maior rebanho mundial de equinos e o maior rebanho comercial de bovinos (Relatório Animal 2018, Perfil Pecuária no Brasil), com aproximadamente 5,8 milhões de equinos, sendo 1,1 milhão de cabeças destinadas ao esporte ou lazer, e aproximadamente 220 milhões de bovinos. Já na espécie ovina o país possui aproximadamente 18,4 milhões de animais (IBGE,2019).

Desde o nascimento do primeiro produto de transferência de embrião (TE) em equinos (Oguri e Tsutsumi, 1974), a técnica vem sendo largamente utilizada e estudada na espécie. Tradicionalmente a TE era utilizada para se obter prenhez de éguas subfêrteis, porém, atualmente seu principal uso é para aumentar o número de descendentes de éguas consideradas de alto valor zootécnico (Carnevale *et al.*, 2000). Uma das principais vantagens da coleta de embriões é a possibilidade de criopreservar as estruturas e facilitar sua comercialização. No entanto, devido a características específicas do embrião equino, essa técnica tem seu uso limitado na espécie (Betteridge, 2010). A criopreservação de embriões equinos em estágio de mórula compacta ou blastocisto inicial com diâmetro <300 µm permite a obtenção de taxas de prenhez satisfatórias (Slade *et al.*, 1985; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). Entretanto, estes estágios de desenvolvimento só são observados entre os dias 6 e 6,5 após ovulação, quando a proporção de embriões recuperados por coleta é inferior a 50% (Hinrichs e Choi, 2016). Ao realizar a coleta nos dia 7 a 8 pós ovulação, as taxas médias de recuperação se elevam para aproximadamente 75% (Carnevale *et al.*, 2000). Porém, estas estruturas coletadas são maiores, com média de 400 a 800 µm, respectivamente (Betteridge *et al.*, 1982), tornando-as mais sensíveis ao processo de criopreservação (Bass *et al.*, 2004; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Barfield *et al.*, 2009). Quando essas estruturas são submetidas a micromanipulação para colabamento da blastocele, foi observado um incremento na taxa de prenhez obtida a

partir de embriões criopreservados (Choi *et al.*, 2010). Considerando que o alto custo e a complexidade dos equipamentos de micromanipulação reduzem sua utilização “a campo”, um dos objetivos desta dissertação foi testar uma alternativa de microssecção manual para colabamento da blastocele.

Visando reduzir o intervalo entre gerações e maximizar os ganhos dos produtores pela redução dos dias não produtivos dos animais da propriedade, o início da vida reprodutiva das novilhas aos 14 meses é uma necessidade. Em zebuínos já está estabelecido que a aplicação de progesterona injetável (iP4) antes do início de programas de inseminação em tempo fixo (IATF) melhora os índices de prenhez (Morotti *et al.*, 2018). Porém, ainda existem poucos estudos com o uso dessa estratégia hormonal em novilhas *Bos taurus* e suas cruzas (Rocha, 2011), que atingem a puberdade, em média, antes dos animais *Bos indicus* (Day e Nogueira, 2013). Assim sendo, foi realizado um experimento para verificar a viabilidade da aplicação de iP4 em novilhas *Bos taurus* e suas cruzas antes do início de programas de IATF.

O uso de progestágenos na indução da ciclicidade e sincronização de cio em ovinos é uma alternativa bastante eficiente e utilizada em diversos sistemas produtivos (De *et al.*, 2015). Um dos grandes limitantes para disseminação do uso desses protocolos é relacionado ao custo do implante de progestágeno. Assim sendo, baseado nos efeitos do uso de iP4 em bovinos (De Lima *et al.*, 2020), foi avaliado o uso dessa apresentação de progesterona na indução de ciclicidade de ovelhas fora da estação reprodutiva.

Com isso, essa dissertação tem como objetivos: (1) revisar os métodos e suportes utilizados para vitrificação de embriões equinos; (2) determinar a viabilidade de uma técnica manual de microssecção embrionária para redução da blastocele de embriões equinos visando melhorar sua criotolerância a vitrificação; (3) determinar a influência da aplicação de progesterona injetável (iP4) em novilhas *Bos taurus* antes de um programa de inseminação por tempo fixo (IATF); e (4) determinar a viabilidade do uso da iP4 na indução e sincronização de estro em ovelhas fora da estação reprodutiva.

## **2 Artigos**

### **2.1 Artigo 1**

#### **Vitrificação de embriões equinos: alternativas para melhorar as taxas de sobrevivência embrionária**

Andrez Pastorello Bohn; Arnaldo Diniz Vieira; Rafael Gianella Mondadori

Publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal

**Vitrificação de embriões equinos: alternativas para melhorar as taxas de sobrevivência embrionária**  
 Vitrification of equine embryos: alternatives to improve embryonic survival rates

**Andrez Pastorello Bohn<sup>1</sup>; Arnaldo Diniz Vieira<sup>1</sup>; Rafael Gianella Mondadori<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPEL),  
 Campus Capão do Leão, RS, Brasil

Correspondência: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade DE Veterinária, Campus Universitário S/Nº,  
 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil. (53) 3275 7189.

**Resumo**

A criopreservação de embriões permite a criação de um banco genético de alto valor zootécnico, aproveitando-se do melhor momento reprodutivo das doadoras, facilitando a comercialização de material genético. Os crioprotetores utilizados durante o processo de vitrificação, afetam o equilíbrio osmótico, evitando a formação de cristais de gelo durante a diminuição de temperatura. Além da escolha adequada dos crioprotetores, o sistema de envase utilizado e a característica de manipulação prévia a vitrificação, impactam a viabilidade embrionária pós aquecimento. Apesar dos protocolos de vitrificação para embriões pequenos (<300 µm) apresentarem taxas de prenhez aceitáveis, no momento de coletar essas estruturas da doadora a taxa de recuperação embrionária é baixa. Entretanto quando são avaliados os índices de sobrevivência de embriões grandes (>300 µm), que apresentam maior taxa de recuperação, os mesmos protocolos não apresentam sucesso. A eficiência do processo de vitrificação em estruturas maiores está relacionada a redução do tamanho da blastocela, exigindo equipamentos de maior custo. O objetivo dessa revisão é descrever o “estado da arte” da vitrificação de embriões equinos, descrevendo diferentes protocolos de vitrificação, manipulação prévia e sistema de envase.

**Palavras-chave:** criopreservação, vitrificação de embriões, crioprotetores, biotecnologias, TE.

**Abstract**

*Embryo cryopreservation allows the formation of a genetic bank from high genetical value animals, taking advantage of the best reproductive moment of the mares, facilitating its genetic material commercialization. Cryoprotectants used during the vitrification process act in osmotic equilibrium, preventing ice crystals formation during the temperature decrease. In addition to the appropriate choice of cryoprotectants, the characteristic of support/packaging used and the type of manipulation prior to vitrification impact the embryonic viability after heating. Although vitrification protocols for small embryos (<300 µm) have acceptable pregnancy rates, their recovery rate is low. However, large embryos (> 300 µm) have higher recovery rates but low survival rates when the same protocols are used. Vitrification efficiency in larger structures is related to the reduction of blastocela size, requiring equipment with higher cost. The purpose of this review is to describe the state of the art of equine embryo vitrification by describing different vitrification protocols, previous manipulation and different storage systems.*

**Keywords:** cryopreservation, embryo vitrification, cryoprotectant, biotechnology, ET.

**Introdução**

A criopreservação de embriões equinos em estágio de mórula compacta ou blastocisto inicial com diâmetro <300 µm permite a obtenção de boas taxas de prenhez (Slade *et al.*, 1985; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). Porém, estes estágios de desenvolvimento só são observados entre os dias 6 e 6,5 após a ovulação (D6 e 6,5), quando a taxa de embriões recuperados (D6 - 0% e em D6,5 - 53%) é inferior que no D7 (52%) (Battut *et al.*, 1997) e D8, onde o embrião apresenta diâmetro superior (Mccue *et al.*, 2010). A menor taxa de recuperação se deve ao atraso no deslocamento do embrião pelo oviduto (Hinrichs e Choi, 2016). Assim sendo, adiar o momento da coleta representa uma alternativa para melhorar a taxa de recuperação.

Embriões equinos recuperados a partir do D7 geralmente possuem diâmetro >300 µm, porém, já apresentam uma membrana glicoproteica (cápsula) no espaço perivitelino. Tais características dificultam o processo de criopreservação, que depende da substituição do conteúdo hídrico do embrião por crioprotetor, o que é dificultado pelo grande volume da blastocela e a baixa permeabilidade da cápsula (Scott *et al.*, 2012).

Desta forma, alternativas para reduzir o volume da blastocle dos embriões grandes e facilitar a permeabilidade do crioprotetor, tem demonstrado resultados promissores na melhora das taxas de criopreservação dessas estruturas (Choi et al., 2010; Scherzer et al., 2011; Diaz et al., 2016; Ferris et al., 2016; Weiss et al., 2016; Sanchez et al., 2017; Wilsher et al., 2018).

Dentre as estratégias utilizadas, estão a microperfuração por laser (Scherzer et al., 2011), micropunção manual (Ferris et al., 2016) ou assistida por micromanipulador (Choi et al., 2010; Diaz et al., 2016; Weiss et al., 2016; Sanchez et al., 2017; Wilsher et al., 2018). Nos trabalhos onde o colabamento da blastocle foi induzido, houve uma indicação de melhora na taxa de sobrevivência após a criopreservação por vitrificação, especialmente quando foi utilizada uma solução de vitrificação contendo dimetil sulfóxido (DMSO) e sistemas de envase abertos (Weiss et al., 2016; Sanchez et al., 2017; Wilsher et al., 2018). Desta forma, o objetivo deste trabalho é descrever o “estado da arte” da vitrificação de embriões equinos, descrevendo protocolos de vitrificação, manipulação prévia e sistemas de envase descritos na literatura.

### **Vitrificação**

A vitrificação é um processo de criopreservação baseado na solidificação sem organização de cristais de gelo, atingindo um estágio amorfo com aspecto semelhante ao vidro. Essa condição pode ser obtida por diferentes vias, entretanto, para criopreservação mais eficiente é necessário a redução do volume das amostras e o uso de agentes crioprotetores para que seja possível atingir o estado vítreo. Nesse aspecto, os sistemas de envase (abertos ou fechados) para acondicionamento/armazenamento dos embriões podem afetar significativamente a velocidade de resfriamento, afetando a eficiência da vitrificação. Da mesma forma, a composição das soluções crioprotetoras afeta a capacidade de vitrificação e manutenção do estado vítreo, além de ter um importante papel no efeito tóxico sobre o embrião. Considerando o exposto, será feita uma descrição dos diferentes envases e soluções utilizadas na vitrificação de embriões equinos (Vajta e Nagy, 2006)

### **Soluções de vitrificação – crioprotetores**

Assim como outros métodos de criopreservação, a vitrificação leva a um rearranjo da estrutura da membrana biológica, interferindo em sua funcionalidade (Holt, 2000). Os crioprotetores tem o objetivo de proteger os embriões dos efeitos críticos do processo. O mecanismo de proteção celular ocorre em parte, pela redução do ponto de solidificação das soluções durante o processo, entre outros fatores não totalmente elucidados (Fahy et al., 1987).

Os crioprotetores são solutos orgânicos que auxiliam na proteção de organelas, e uma das suas principais funções é remover e/ou substituir a água intracelular (Dobrinsky, 1996). Os agentes crioprotetores são utilizados para modular a formação de cristais de gelo quando se realiza a criopreservação, porém, a concentração do crioprotetor nos meios de criopreservação deve ser determinada pelo equilíbrio entre a prevenção da formação de cristais e a toxicidade da substância (Fahy, 1986; Fahy et al., 1987; Mclellan e Day, 1995). A toxicidade e o estresse osmótico são os principais causadores de danos as células (Papadopoulos et al., 2002) quando se utiliza altas concentrações de crioprotetores, por isso é importante a obtenção de altas taxas de resfriamento, reduzindo a toxicidade e fazendo com que o tempo de exposição do embrião as temperaturas próximas ao ponto de formação de cristais de gelo seja menor (Arav et al., 1993).

Os crioprotetores podem ser intra ou extracelulares (Fahy, 1987). Os mais utilizados para vitrificação de embriões equinos são o etilenoglicol (EG), glicerol (GLI) e o dimetil sulfóxido (DMSO), que são crioprotetores intracelulares. O EG e o GLI não possuem efeitos notavelmente tóxicos a membrana celular, sendo que o DMSO é o que requer maior atenção ao ser utilizado (Best, 2015). As suas ações protetoras são atribuídas as suas propriedades coligativas e ligantes com a água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular (Holt, 2000). Temperaturas elevadas aumentam a velocidade de permeação dos crioprotetores, essa característica é bastante marcada para o DMSO, cuja hidrofobicidade aumenta com o aumento da temperatura, o que explica a crescente toxicidade do mesmo (Westh, 2004). Por sua vez, os crioprotetores extracelulares atuam na proteção da membrana celular e por osmose, promovendo a desidratação celular controlada, sendo os principais representantes as macromoléculas de diferentes açúcares, como sacarose e glicose (Niemann, 1991).

## Sistema de acondicionamento do embrião

### *Palheta fechada*

A palheta fina (0,25 mL), é tradicionalmente utilizada no processo de congelamento, podendo também ser utilizada para vitrificação de embriões pequenos (<300 µm). Por possuir grande volume, esse tipo de suporte limita a taxa de resfriamento a aproximadamente 2500°C/minuto quando é mergulhada no nitrogênio líquido, não sendo ideal para a vitrificação. Para aumentar a velocidade de resfriamento para aproximadamente 20.000°C/minuto, de modo a facilitar a vitrificação, deve ser reduzido o volume de meio ao redor do embrião (Carnevale, 2006; Stout, 2012).

### *Open Pulled Straw (OPS)*

Método desenvolvido inicialmente para a vitrificação de oócitos e embriões bovinos (Vajta et al., 1998), onde a extremidade da palheta de 0,25 mL é aquecida e estirada, levando a uma diminuição de diâmetro. Por esse método as estruturas são envasadas em volumes de 1 ou 2 µL de meio de vitrificação na extremidade afilada, que é mantida aberta. O método foi utilizado para vitrificação de embriões equinos recuperados D6-6,5 pós-ovulação, utilizando 2 µL de soluções de vitrificação a base de DMSO e EG e sacarose. Nas avaliações in vitro, a vitrificação em OPS mostrou ser mais eficiente que a congelação convencional, obtendo-se uma menor taxa de embriões degenerados depois de três horas de cultivo, mas para confirmar a real eficiência da técnica deve-se transferir os embriões a éguas receptoras (Moussa et al., 2005).

### *Cryoloop*

A primeira utilização do Cryoloop foi para a vitrificação de embriões de camundongo (Lane et al., 1999). A estrutura é composta por um círculo de nylon com espessura de 20 µm e diâmetro entre 0,5 a 0,7 mm. Em 2001 o suporte foi utilizado para a vitrificação de embriões equinos <300 µm, com soluções a base de DMSO, EG e sacarose. Após vitrificação e aquecimento, durante cultivo in vitro, foi observado incremento na qualidade dos embriões (Oberstein et al., 2001).

### *Hemi-palheta*

O sistema foi desenvolvido para a vitrificação de ovócitos e embriões humanos em estágio de blastocisto (Vanderzwalmen et al., 2000). A hemi-palheta é produzida manualmente mediante um corte longitudinal em uma palheta de 0,25 mL, onde o embrião é depositado com um pequeno volume de solução de vitrificação. Esse sistema foi utilizado com embriões equinos no estágio de blastocisto expandido (>300 µm) submetidos ao colapamento da blastocele. Com esse sistema, a transferência dos embriões vitrificados com solução a base de DMSO, EG e sacarose, resultou em 70% de prenhez (Sanchez et al., 2017).

### *Cryolock*

O sistema Cryolock está disponível comercialmente e permite que a estrutura seja vitrificada com menos de 1 µL de solução de vitrificação, demonstrando bons resultados em embriões equinos (Diaz et al., 2016). As soluções de vitrificação utilizadas foram a base de GLI e EG, seriadas em 3 concentrações e uma solução de diluição a base de galactose. É importante ressaltar que as estruturas criopreservadas possuíam diâmetro >300 µm e tiveram sua blastocele colapsada por aspiração com uso de micromanipulador. Os autores obtiveram cinco prenhez de um total de seis embriões (83%) submetidos a esse tratamento.

### *Cryoleaf*

O Cryoleaf é um dispositivo para armazenamento e vitrificação de embriões e ovócitos, desenvolvido na Universidade de McGill, Montreal, Canadá. Ovócitos e embriões são preparados para a vitrificação de acordo com os protocolos de cada laboratório ou operador. Esse dispositivo proporciona vitrificação com baixo volume de meio, sendo a estrutura vitrificada em volume inferior a 1 µL (Lopez et al., 2012).

O sistema foi utilizado para vitrificação de embriões equinos, com o colapso de blastocele assistido por laser. As soluções de vitrificação tiveram EG e DMSO, utilizadas em duas séries de concentrações. Os

procedimentos resultaram em quatro prenhezos aos 11 dias, após a transferência de nove embriões (Scherzer et al., 2011).

As descrições demonstram que os diferentes sistemas de acondicionamento, com seus pontos positivos e limitações, já foram utilizados com relativo sucesso na vitrificação de embriões equinos.

### **Métodos de colabamento de blastocele**

#### *Microperfuração por laser*

O método de microperfuração da blastocele por um sistema de laser é baseado em pulsos de laser direcionados a cápsula embrionária e a junção celular do trofotoderma. A abertura gerada pelos pulsos do laser permitem a saída do fluido da blastocele e a entrada da solução crioprotetora durante o processo de estabilização (Scherzer et al., 2007). Para a realização da perfuração, o embrião é posicionado com o embrioblasto na posição de nove horas e o laser penetra no embrião na posição de três horas (Scherzer et al., 2011).

A primeira utilização da microperfuração a laser foi descrita para embriões humanos, cujo objetivo foi melhorar as taxas de sobrevivência de blastocistos expandidos (Mukaida et al., 2006). Nesse trabalho, dos 40 embriões do grupo tratamento, foram obtidas 39 gestações (97,5%). O indicativo de sucesso com embriões humanos, estimulou o utilização da técnica em embriões equinos com diâmetro >300 µm, que foram posteriormente vitrificados com soluções de a base de DMSO e EG, utilizando o sistemas de acondicionamento CryoLeaf. O grupo tratamento resultou em quatro gestações aos 14 dias de um total de 11 embriões transferidos (Scherzer et al., 2011), segundo os autores, mais estudos tem que ser realizados para avaliar a criobriologia dos embriões equinos, visto que apenas uma receptora levou a gestação a termo.

#### *Micropunção com uso de micromanipulador*

Utilizando micromanipulador, diferentes métodos de micropunção realizados com diferentes ferramentas de manipulação embrionária já foram realizados. Os micromanipuladores usualmente utilizados para realizar a micropunção, são equipados com um braço para manter a posição do embrião com a pipeta (holding), e o outro braço no qual se acopla a agulha (diferentes diâmetros) para realizar o colapso da blastocele. Esses equipamentos foram utilizados em diversos trabalhos (Choi et al., 2010; Ferris et al., 2016; Weiss et al., 2016; Sanchez et al., 2017; Wilsher et al., 2018), sendo obtidas taxas de prenhez variáveis, o que estimula a realização de outros estudos.

Dentre os micromanipuladores o GeneSearch Embryo Cradle® é um equipamento que possui apenas um braço de manipulação, onde a pipeta que faz a microinjeção passa pelo interior da pipeta holding, responsável por manter a posição do embrião (Diaz et al., 2016). Esse equipamento também se mostrou eficiente no colabamento da blastocele de embriões equinos grandes antes da vitrificação, permitindo que a transferências dessas estruturas gerasse taxa de gestação de 83,3%.

#### *Punção manual*

Esse método tem por objetivo gerar uma alternativa ao uso de equipamentos de elevado valor (micromanipulador). O procedimento consiste da realização do colapso da blastocele pela punção com agulha de 25 G com controle manual. Os dados disponíveis mostram que a micromanipulação manual (prenhez de 46,7%) não foi capaz de superar a micromanipulação assistida por equipamento (prenhez de 73%) (Ferris et al., 2016).

### **Considerações finais**

Conforme ficou evidenciado nos dados apresentados, embriões maiores (maior taxa de recuperação) não apresentam boas taxas de sobrevivência quando submetidos ao processo de criopreservação, assim sendo, o número de transferências de embriões equinos aumentou significativamente, sendo que o número de embriões criopreservados não acompanhou esse crescimento. Com o desenvolvimento de técnicas acessíveis, como o colapso manual da blastocele, acredita-se que o uso da criopreservação aumente, conforme demonstrado por Wilsher et al. (2018) que obtiveram taxas de prenhez satisfatórias com embriões criopreservados. O desenvolvimento das técnicas será fomentado pela necessidade do mercado, sendo esse um mercado disponível em todo mundo e ainda possui um vasto campo para pesquisa buscando melhorar os

resultados, o que indica que a pesquisa de soluções para os problemas enfrentados atualmente seja brevemente contornado. Considerando o exposto se torna evidente as dificuldades em concluir qual é a melhor opção a ser escolhida e estabelecer um protocolo padrão, bem como, a necessidade de prosseguir com as atividades de pesquisa na área.

### Referências

- Arav A, Shehu D, Mattioli MJR.** Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, v. 99, n. 2, p. 353-358, 1993.
- Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF.** Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet J*, n. 25, p. 60-2, 1997.
- Best BP.** Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*, v. 18, n. 5, p. 422-36, 2015.
- Carnevale EM.** Vitrification of equine embryos. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v. 22, n. 3, p. 831-41, 2006.
- Choi YH, Gustafson-Seabury A, Velez IC, Hartman DL, Bliss S, Riera FL, Roldan JE, Chowdhary B, Hinrichs K.** Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction*, v. 140, n. 6, p. 893-902, 2010.
- Diaz F, Bondioli K, Paccamonti D, Gentry GT.** Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology*, v. 85, n. 5, p. 894-903, 2016.
- Dobrinsky JR.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 17-26, 1996.
- Eldridge-Panuska WD, Di Brienza VC, Seidel GE, Jr., Squires EL, Carnevale EM.** Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v. 63, n. 5, p. 1308-19, 2005.
- Fahy GM.** The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.
- Fahy GM, Levy DI, Ali SE.** Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*, v. 24, n. 3, p. 196-213, 1987.
- Ferris RA, Mccue PM, Trundell DA, Morrissey JK, Barfield JP.** Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse. *J Equine Vet Sci*, v. 41, p. 64-65, 2016.
- Hinrichs K, Choi YH.** Micromanipulation of equine blastocysts to allow vitrification. *Rep Fertil Dev*, 2016.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK.** Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril*, v. 72, n. 6, p. 1073-8, 1999.
- Lopez E, Cipri K, Naso V.** Technologies for Cryopreservation: Overview and Innovation. In: (Ed.). *Current Frontiers in Cryobiology*, 2012. cap. Chapter 11.
- Mccue PM, Ferris RA, Lindholm A, Deluca C, Moyer W.** Embryo recovery procedures and collection success: results of 492 embryo-flush attempts. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 2010. p.318-321.
- McLellan MR, Day JG.** Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. *Methods Mol Biol*, v. 38, p. 1-5, 1995.
- Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas JF.** In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v. 64, n. 7, p. 1619-32, 2005.
- Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K.** Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*, v. 21, n. 12, p. 3246-52, 2006.
- Niemann HJT.** Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, v. 35, n. 1, p. 109-124, 1991.
- Oberstein N, O'donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE, Jr., Carnevale EM, Squires EL.** Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, v. 55, n. 2, p. 607-13, 2001.

- Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland M, Lonergan PJaRS.** Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci*, v. 74, n. 1-2, p. 35-44, 2002.
- Sanchez R, Blanco M, Weiss J, Rosati I, Herrera C, Bollwein H, Burger D, Sieme H.** Influence of Embryonic Size and Manipulation on Pregnancy Rates of Mares After Transfer of Cryopreserved Equine Embryos. *J Equine Vet Sci*, v. 49, p. 54-59, 2017.
- Scherzer J, Davis C, Hurley DJ.** Laser-assisted vitrification of large equine embryos. *Reprod Domest Anim*, v. 46, n. 6, p. 1104-6, 2011.
- Scherzer J, Fayrer-Hosken R, Ray L, Heusner GJR.** A new approach to cryopreservation of large equine embryos by vitrification after blastocoel micromanipulation. *Reprod Fertil Dev*, v. 19, n. 1, p. 225-226, 2007.
- Scott BR, Carwell DB, Hill RA, Bondioli KR, Godke RA, Gentry GT.** Evaluation of Capsule Permeability in the Equine Blastocyst. *J Equine Vet Sci*, v. 32, n. 12, p. 795-798, 2012.
- Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsdon RP, Seidel GE, Jr.** A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology*, v. 24, n. 1, p. 45-58, 1985.
- Stout TA.** Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art. *Reprod Domest Anim*, v. 47 Suppl 3, p. 84-9, 2012.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.** Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v. 51, n. 1, p. 53-8, 1998.
- Vajta G, Nagy ZP.** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, v. 12, n. 6, p. 779-96, 2006.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaart V, Schoysman E.** Survival of Metaphase II Oocytes (MII) and Blastocysts After Vitrification in a Hemi-Straw (HS) System. *Fertil Steril*, v. 74, n. 3, p. S215-S216, 2000.
- Weiss J, Blanco M, Sanchez R, Arbouin C, Schockemöhle P.** Comparison between an open and a closed vitrification system for equine forced-collapsed embryos. *J Equine Vet Sci*, v. 41, p. 52-53, 2016.
- Westh P.** Preferential interaction of dimethyl sulfoxide and phosphatidyl choline membranes. *Biochim Biophys Acta*, v. 1664, n. 2, p. 217-23, 2004.
- Wilsher S, Rigali F, Couto G, Camargo S, Allen WR.** Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid. *Equine Vet J*, 2018.

## **2.2 Artigo 2**

### **Colabamento manual de blastocele não foi efetivo para aumentar a viabilidade de embriões equinos vitrificados**

Andrez Pastorello Bohn; Arnaldo Diniz Vieira; Bernardo Garziera Gasperin; Thomaz Lucia Junior; Rafael Gianella Mondadori

Submetido à revista Acta Veterinária Brasilica

## COLABAMENTO MANUAL DA BLASTOCELE NÃO FOI EFETIVO PARA AUMENTAR A VIABILIDADE DE EMBRIÕES EQUINOS VITRIFICADOS

**RESUMO** - Métodos de criopreservação de embriões têm sido utilizados para a formação de bancos genéticos de éguas. Maiores taxas de coleta embrionária em éguas são obtidas quando a lavagem uterina é realizada entre 7 a 8 dias pós ovulação. A criopreservação de embriões equinos com diâmetro <300  $\mu\text{m}$ , coletados 6-6,5 dias após a ovulação, permite a obtenção de taxas de prenhez satisfatórias. Entretanto, embriões com diâmetro >300  $\mu\text{m}$ , coletados a partir do 7º. dia pós-ovulação, somente são adequadamente criopreservados quando submetidos a micromanipulação para colabamento da blastocele. Objetivando avaliar a viabilidade da punção da blastocele com equipamento de baixa sofisticação e custo, 22 embriões coletados no 8º. dia pós-ovulação (D8) foram alocados aos seguintes grupos: (1) micropunção com uma agulha 30 G assistida por micromanipulador antes da vitrificação (n=4); (2) microssecção manual por lâmina antes da vitrificação (n=6); (3) sem manipulação anterior à vitrificação (n=8); e (4) transferidos a fresco (n=4). Apesar de altas taxas de reexpansão após a criopreservação, os embriões manipulados previamente a vitrificação não resultaram em prenhez aos 25 dias. Tanto os embriões não micromanipulados, quanto os transferidos a fresco resultaram em prenhez aos 25 dias. Nas condições do presente estudo, a microssecção manual não se mostrou viável como método para aumento da criotolerância de embriões grandes (>300  $\mu\text{m}$ ), necessitando um aprimoramento visando a obtenção de prenhez.

**Palavras-Chave:** criopreservação; biotecnologia da reprodução; blastocisto; cápsula embrionária.

### INTRODUÇÃO

A técnica de recuperação e transferência de embriões equinos não criopreservados (a fresco), é consolidada e utilizada desde a década de 1970 (ALLEN e ROWSON, 1975). A coleta dos embriões normalmente se dá entre o 7º. e 8º. dia após a ovulação, quando o seu diâmetro varia de 130 a 1344 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) (MCCUE *et al.*, 2010; CUERVO-ARANGO *et al.*, 2019). Taxas de prenhez satisfatórias com embriões equinos criopreservados são obtidas com embriões de diâmetro inferior a 300  $\mu\text{m}$ , nos estágios de mórula compacta ou

blastocisto inicial (SLADE *et al.*, 1985; ELDRIDGE-PANUSKA *et al.*, 2005), o que exige que o lavado para recuperação embrionária seja realizado em torno de 6,5 dias após a ovulação (MCCUE *et al.*, 2010). Porém, nesse período, a proporção de embriões recuperados por coleta é inferior a 50%. A baixa taxa de recuperação está relacionada com a possibilidade de atraso no deslocamento do embrião pelo oviduto (HINRICHS e CHOI, 2016). Assim sendo, um maior intervalo entre a ovulação e a coleta está relacionado com aumento na taxa de recuperação de embriões (BATTUT *et al.*, 1997) e, portanto, com a coleta de embriões com diâmetro superior a 300  $\mu\text{m}$ . Esses embriões recuperados com diâmetro  $>300 \mu\text{m}$ , geralmente a partir de D7, apresentam uma membrana glicoproteica (cápsula) no espaço perivitelinico, já que essa estrutura apresenta baixa permeabilidade e o embrião grande volume da blastocele (SCOTT *et al.*, 2012).

Ainda que diversos estudos tenham visado aprimorar as técnicas de criopreservação de embriões equinos, as alternativas para a criopreservação de embriões com as características descritas anteriormente apresentam limitações (BARFIELD *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2010; SCHERZER *et al.*, 2011; DIAZ *et al.*, 2016; FERRIS *et al.*, 2016; WEISS *et al.*, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2017). Diversas técnicas como desidratação osmótica (BARFIELD *et al.*, 2009), microperfuração por laser (SCHERZER *et al.*, 2011), micropunção manual (FERRIS *et al.*, 2016), ou assistida por micromanipulador (CHOI *et al.*, 2010; DIAZ *et al.*, 2016; WEISS *et al.*, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2017), já foram testadas no intuito de reduzir o diâmetro do embrião a ser criopreservado e melhorar sua sobrevivência. No entanto, algumas destas técnicas envolvem a utilização de micromanipuladores, que são equipamentos de alto valor agregado, e que exigem treinamento especializado para sua operação, o que restringe sua utilização principalmente a centros de pesquisa (BREDBACKA *et al.*, 1995), limitando sua aplicação comercial. Paralelamente, houve uma melhora na taxa de sobrevivência embrionária após a vitrificação, através de aprimoramentos na solução de vitrificação, por exemplo, com a adição de dimetil sulfoxido (DMSO) e a utilização de suportes abertos (WEISS *et al.*, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2017; WILSHER *et al.*, 2018).

Diante do exposto, segundo a literatura disponível, a associação do colabamento da blastocele por micromanipulação com a vitrificação em suportes abertos e o uso de uma solução de vitrificação adequada representa uma metodologia promissora para a criopreservação de embriões equinos com diâmetro maior que 300  $\mu\text{m}$ , devido a

capacidade de aumento da velocidade de resfriamento pelo baixo volume de meio utilizado no processo. Porém, a necessidade do uso de equipamentos de alto custo para o colapamento da blastocele, limita a sua aplicabilidade. Como busca de uma solução para o problema, esse artigo propõe o uso da técnica manual de micromanipulação desenvolvida para realização de biópsias embrionárias em condições de campo (BREDBACKA *et al.*, 1995) como alternativa para o colapamento da blastocele de embriões equinos previamente ao processo de vitrificação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Parecer 110/2018/CEEA/REITORIA).

Foram utilizadas 20 éguas doadoras de embriões, da raça Crioula, com idade média de 8,5 anos (2 a 19). Foram realizados 65 lavados uterinos, em média 3,3 (1 a 8) lavados por égua doadora, dos quais foram coletados 35 embriões. Previamente, as éguas foram submetidas ao controle do desenvolvimento folicular através de ultrassonografia, visando a identificação do momento adequado para a indução da ovulação. Quando o folículo atingiu diâmetro de 35mm, a ovulação foi induzida com 1000 UI IM de hCG (gonadotrofina coriônica humana) (JACOB *et al.*, 2012). A inseminação artificial (IA) foi realizada com sêmen fresco ou refrigerado, na dose mínima de  $500 \times 10^6$  espermatozoides viáveis, 24 horas após a indução da ovulação (JACOB *et al.*, 2012). O momento da ovulação foi considerado o dia 0 (D0) e todos os lavados uterinos foram realizados no D8 (MCCUE e SQUIRES, 2015).

As lavagens uterinas foram realizadas com a técnica de sistema fechado (SCOTT *et al.*, 2012), utilizando, em média, 3 litros de ringer lactato por procedimento. O conteúdo do filtro coletor de embriões foi transferido para uma placa de Petri, possibilitando a localização e mensuração do embrião. O diâmetro embrionário foi determinado com o auxílio de uma lente ocular graduada em um estereoscópio previamente calibrado. Após esses procedimentos, os embriões foram transferidos serialmente entre gotas para

lavagem e, posteriormente, mantidos em meio holding (MCCUE e SQUIRES, 2015), sobre uma mesa aquecedora a 37°C, até a definição do grupo experimental.

Os embriões foram alocados em quatro grupos experimentais: (1) MP- micropunção com uma agulha 30 G assistida por micromanipulador antes da vitrificação (n=4); (2) MS - microsecção manual por lâmina antes da vitrificação (n=6); (3) SM - sem manipulação prévia à vitrificação (n=8); e (4) FR - transferidos a fresco (n=4).

Nos grupos submetidos a criopreservação, a vitrificação foi realizada em hemi-palhetas (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000). Inicialmente, o embrião foi exposto a solução de estabilização (SE: 7,5% Dimetilsulfoxido (DMSO) + 7,5% Etilenoglicol (EG) + (*Tissue Culture Medium* (TCM) -Hepes), a 37 °C, por 150 segundos. Em seguida, o embrião foi transferido para a solução de vitrificação (SV: 15% DMSO + 15% EG + 0,5M Sacarose (SAC) e imerso em nitrogênio líquido em 30 segundos (SCHERZER *et al.*, 2011). O embrião, juntamente com 2 µL de SV, foi acondicionado em uma hemi-palheta e imediatamente imerso no nitrogênio líquido. Cada hemi-palheta 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.

O aquecimento foi executado conforme descrito por Scherzer et al. (SCHERZER *et al.*, 2007), com adaptações. A hemi-palheta contendo o embrião foi exposta ao ar por 10 segundos e em seguida imersa na Solução de aquecimento 1 (SA1): TCM199 + Soro Fetal Bovino (SFB) + 0,5M SAC) mantida a 39 °C, durante 30 segundos. Então, o embrião foi transferido para a Solução de aquecimento 2 (SA2) (TCM199 + SFB + 0,25M SAC), na qual permaneceu por 4 minutos antes de ser colocado no meio TCM199 + SFB (20%). Posteriormente o embrião foi envasado em uma palheta de 0,5 mL e inovulado por via cervical (MCCUE e SQUIRES, 2015).

No grupo MP, os embriões foram puncionados com uma agulha 30G acoplada a um micromanipulador mecânico. Após a fixação do embrião em uma pipeta *holding*, a agulha foi inserida na blastocle pelo lado oposto do botão embrionário. O diâmetro médio dos embriões de grupo foi 900 µm (660-1560 µm).

No grupo MS, os embriões foram submetidos a metodologia manual de microsecção (BREDBACKA *et al.*, 1995), usando como lâmina um fragmento de lâmina de barbear. Foi realizada uma incisão na blastocele, no lado oposto do botão embrionário. Nesse grupo, o diâmetro médio dos embriões foi de 940  $\mu\text{m}$  (660-1500  $\mu\text{m}$ ).

No grupo SM, os embriões vitrificados tinham em média 528  $\mu\text{m}$  (180-1140  $\mu\text{m}$ ). Os embriões do grupo FR tinham em média 360  $\mu\text{m}$  (180-480  $\mu\text{m}$ ), tendo sido inovulados sem criopreservação ou micromanipulação.

As receptoras utilizadas eram éguas predominantemente da raça Crioula, com idade média de 5,25 anos (entre 4 e 14 anos), que estavam em regime exclusivo de pasto nativo, com suplementação com sal mineral e acesso a água *ad libitum*. As receptoras foram mantidas separadas das doadoras, tendo seu ciclo estral monitorado por exame de palpação retal auxiliado por ultrassom. O dia da ovulação foi considerado o dia 0 (D0). Todos os embriões foram transferidos quando as receptoras estavam no D5 do ciclo, ou seja, -3 em referência a doadora (JACOB *et al.*, 2012).

A ablação da blastocele dos embriões dos grupos MP ou MS foi confirmada por visualização do colapso da estrutura e consequente redução do diâmetro embrionário em estereomicroscópio. Antes da inovulação, após o aquecimento, todos os embriões foram avaliados conforme a sua capacidade de reexpansão em meio holding, sendo envasados e inovulados.

Para a inovulação (TE), os embriões foram envasados em palhetas de 0,5 mL estéreis no meio de 3 colunas de meio holding, separadas por ar. A palheta foi colocada em um inovulador de embriões para palhetas de 0,5 mL e em uma bacia para TE com camisa sanitária estéril (MCCUE e SQUIRES, 2015).

Após a inovulação, as receptoras foram mantidas nas mesmas condições de alojamento e o primeiro diagnóstico de gestação foi feito oito dias após a TE, por exame ultrassonográfico, sendo considerado um diagnóstico positivo quando foi detectada a presença da vesícula embrionária (MCCUE e SQUIRES, 2015). Sete dias após, foi feito o diagnóstico comprobatório (WILSHER, S. *et al.*, 2020).

As éguas receptoras tinham os seguintes dados registrados: 1) dia da ovulação; 2) dia da transferência em relação a ovulação; 3) primeiro diagnóstico de gestação 8 dias após a TE; positivo (presença da vesícula embrionária) ou negativo (ausência da vesícula embrionária); 4) segundo diagnóstico de gestação 7 dias após o primeiro.

Após verificação da normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, o tamanho dos embriões foi comparado por ANOVA e as médias contrastadas pelo Teste de Tukey, sendo considerado o nível de significância de  $P < 0,05$ . Os demais dados não foram submetidos a análise estatística devido ao baixo número de amostras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de recuperação embrionária foi de 53,8% (35/65), dentro da média descrita na literatura (MCCUE *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2012; MCCUE e SQUIRES, 2015). O diâmetro médio dos embriões recuperados foi de 676,9  $\mu\text{m}$ , similar ao descrito na literatura, assim como a sua amplitude de variação, entre 180 a 1560  $\mu\text{m}$  (MCCUE *et al.*, 2010; SCHERZER *et al.*, 2011; MCCUE e SQUIRES, 2015; FERRIS *et al.*, 2016; WILSHER, Sandra *et al.*, 2020). O número de blastocistos expandidos foi de 85,71% (30/35), sendo que o grau de qualidade dos embriões foi similar aos descritos anteriormente (MCCUE *et al.*, 2010; MCCUE e SQUIRES, 2015; FERRIS *et al.*, 2016; CUERVO-ARANGO *et al.*, 2018). Esses dados indicam que os embriões utilizados no presente experimento são representativos na comparação com os estudos citados.

O colapamento manual da blastocele não foi efetivo para aumentar a taxa de prenhez de embriões equinos vitrificados (Tabela 1). A taxa de prenhez para o grupo FR foi consistente com as taxas descritas na literatura (JACOB *et al.*, 2012; CUERVO-ARANGO *et al.*, 2018), evidenciando a capacidade técnica do médico veterinário que realizou os procedimentos. Os embriões com maior diâmetro foram selecionados para serem submetidos ao processo de ablação da blastocele, ou seja, para os grupos MP e MS ( $P < 0,05$ ). Nossos dados sugerem que esses processos provocaram danos irreversíveis nas suas estruturas, inviabilizando que esses embriões pudessem estabelecer prenhez após a TE. Esses resultados coincidem com os observados por Wilsher *et al.* (WILSHER, Sandra *et*

*al.*, 2020), com o uso de agulhas com diâmetro similar, que também relataram lesões na cápsula do embrião e taxas de prenhez insatisfatórias. Entretanto, Ferris et al. (FERRIS *et al.*, 2016) relataram uma taxa de prenhez de 46,7% (7/15), mesmo utilizando uma agulha de calibre maior (25 G). Assim, não é possível inferir sobre as possíveis causas das diferenças de dados de prenhez observadas nos artigos citados.

### Tabela 1

Diâmetro embrionário anterior à manipulação e taxa de prenhez após 16 e 25 dias em éguas receptoras de embriões submetidos a técnicas distintas de processamento

	Processamento			
	MP	MS	SM	FR
Diâmetro embrionário ( $\mu\text{m}$ )				
Média	900 $\pm$ 130,4 <sup>ab</sup>	940 $\pm$ 106,5 <sup>a</sup>	502,5 $\pm$ 92,2 <sup>b</sup>	390 $\pm$ 130,4 <sup>b</sup>
Amplitude	660-1560	660-1500	180-1140	180-480
Taxa de prenhez aos 16 dias	1/4 (25%)	2/6 (33,7%)	4/8 (50%)	3/4 (75%)
Taxa de prenhez aos 25 dias	0/4 (0%)	0/6 (0%)	1/8 (12,5%)	3/4 (75%)

MP: vitrificação após micropunção com uma agulha 30 G assistida por micromanipulador;

MS: vitrificação após microsecção manual por lâmina com controle manual;

SM: vitrificação sem manipulação;

FR: inovulação sem micromanipulação e sem vitrificação.

<sup>ab</sup>Média  $\pm$  SEM com expoentes distintos diferem por  $P < 0,05$

Quanto a taxa de reexpansão após aquecimento, foi observado que 75% (3/4) dos embriões do grupo MP reexpandiram satisfatoriamente enquanto, no grupo MS, a taxa de reexpansão foi de 66,7% (4/6). No grupo SM, no qual não houve manipulação prévia, a taxa de reexpansão foi de 75% (6/8). Esses dados demonstram que, em geral, o processo de criopreservação foi eficiente em manter a funcionalidade dos blastômeros.

O colabamento de blastocele de embriões grandes e a posterior vitrificação mostrou-se promissora em trabalhos que utilizaram equipamentos de microprecisão, mantendo grande parte da capsula embrionária viável (CHOI *et al.*, 2010; SCHERZER *et al.*, 2011; DIAZ *et al.*, 2016; WEISS *et al.*, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2017; WILSHER *et al.*, 2018). Entretanto,

quando se promove uma maior ruptura da cápsula embrionária, como o que provavelmente ocorreu no presente trabalho, as taxas de prenhez são afetadas negativamente (WILSHER, S. *et al.*, 2020). Apesar de não termos avaliado a cápsula embrionária, Stout et al. (STOUT *et al.*, 2005) e Wilsher et al. (WILSHER, Sandra *et al.*, 2020), evidenciam que essa estrutura é essencial para a sobrevivência embrionária nos períodos iniciais da gestação. Assim, aparentemente, as técnicas de manipulação utilizadas no presente experimento causaram lesões severas na cápsula, inviabilizando o desenvolvimento embrionário após TE. Isso fica evidente quando se avaliam dados que mostram que uma pequena punção para realização de biópsia, mantém a viabilidade embrionária (CHOI *et al.*, 2010).

Os embriões do grupo MP, que foram puncionados utilizando uma agulha 30G acoplada a um micromanipulador, geraram apenas uma prenhez aos 16 dias de gestação, a qual não foi confirmada pelo diagnóstico posterior, aos 25 dias. Estes resultados discordam dos descritos por Ferris et al. (FERRIS *et al.*, 2016), que relataram taxa de prenhez de 46% após 14 dias. Cabe ressaltar que no presente trabalho foi utilizada uma agulha com diâmetro inferior ao utilizado por Ferris et al. (FERRIS *et al.*, 2016).

## CONCLUSÃO

A técnica do colabamento manual da blastocle induzido por uma lâmina não se mostrou eficiente para promover a redução do diâmetro embrionário para fins de vitrificação.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R.; ROWSON, L. E. Surgical and non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility Supplements**, n. 23, p. 525-30, 1975.

BARFIELD, J. P. et al. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. **Cryobiology**, v. 59, n. 1, p. 36-41, 2009.

BATTUT, I. et al. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal Supplements**, n. 25, p. 60-2, 1997.

BREDBACKA, P.; KANKAANPAA, A.; PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. **Theriogenology**, v. 44, n. 2, p. 167-76, 1995.

CHOI, Y. H. et al. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 893-902, 2010.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. **Vet Rec**, v. 183, n. 10, p. 323, 2018.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. Small day 8 equine embryos cannot be rescued by a less advanced recipient mare uterus. **Theriogenology**, v. 126, p. 36-40, 2019.

DIAZ, F. et al. Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 894-903, 2016.

ELDRIDGE-PANUSKA, W. D. et al. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1308-19, 2005.

FERRIS, R. A. et al. Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 64-65, 2016.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H. Micromanipulation of equine blastocysts to allow vitrification. **Reproduction, Fertility and Development**, 2016.

JACOB, J. C. et al. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1159-66, 2012.

MCCUE, P. M. et al. Embryo recovery procedures and collection success: results of 492 embryo-flush attempts. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 56, p. 318-321, 2010.

MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. 2015. **Equine embryo transfer**. CRC Press, 184p.

SANCHEZ, R. et al. Influence of Embryonic Size and Manipulation on Pregnancy Rates of Mares After Transfer of Cryopreserved Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 49, p. 54-59, 2017.

SCHERZER, J.; DAVIS, C.; HURLEY, D. J. Laser-assisted vitrification of large equine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1104-6, 2011.

SCHERZER, J. et al. A new approach to cryopreservation of large equine embryos by vitrification after blastocoel micromanipulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 225-226, 2007.

SCOTT, B. R. et al. Evaluation of capsule permeability in the equine blastocyst. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 12, p. 795-798, 2012.

SLADE, N. P. et al. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, v. 24, n. 1, p. 45-58, 1985.

STOUT, T. A.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Anim Reprod Sci**, v. 87, n. 3-4, p. 269-81, 2005.

VANDERZWALMEN, P. et al. Survival of Metaphase II Oocytes (MII) and Blastocysts After Vitrification in a Hemi-Straw (HS) System. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 3, p. S215-S216, 2000.

WEISS, J. et al. Comparison between an open and a closed vitrification system for equine forced-collapsed embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, p. 52-53, 2016.

WILSHER, S.; RIGALI, F.; ALLEN, W. R. Pregnancy rates after manual puncture of equine embryos following direct transfer or vitrification. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103060, 2020.

WILSHER, S. et al. Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid. **Equine Vet J**, 2018.

WILSHER, S. et al. Puncture of the Equine Embryonic Capsule and Its Repair In Vivo and In Vitro. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 93, p. 103194, 2020.

## 3 Experimentos

### 3.1 Experimento 1

#### 3.1.1 Introdução

A pecuária de corte brasileira tem uma forte representação no PIB do país, o que evidencia a força e potencial do setor, somando R\$ 618,6 bilhões em 2019, representando 8,5% do PIB brasileiro (Beef Report, 2020). Desta forma, a busca por aumento da eficiência e produtividade da atividade, a tecnificação do campo se torna cada vez mais evidente, visando melhorar desempenho dos animais e consequentemente a lucratividade do sistema. A utilização de ferramentas que otimizam os resultados em programas reprodutivos, especialmente protocolos hormonais para controle do ciclo estral, tornam possível a utilização de fêmeas mais jovens aliado aos recursos das biotecnologias da reprodução.

Um principal fator de performance reprodutiva é a idade em que as fêmeas atingem a puberdade, sendo um dos pontos críticos na produtividade e saúde financeira de uma propriedade (Day e Nogueira, 2013). Essa idade, além de ser variável é multifatorial. Um dos fatores que influenciam fortemente é a subespécie, pois animais *Bos indicus* normalmente atingem a puberdade mais tarde em relação a animais *Bos taurus* (Day e Nogueira, 2013).

A utilização de hormônios com objetivo da indução da puberdade em fêmeas bovinas previamente ao início da estação reprodutiva é uma ferramenta amplamente utilizada em animais *Bos indicus*. A progesterona (P4) e os progestágenos são a base destes protocolos, datada dos anos 50, sendo as principais formas de administração os dispositivos intravaginas de silicone, esponjas intravaginais impregnadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou progesterona natural, implantes subcutâneos com Norgestomet e progesterona injetável (Ulberg *et al.*, 1951; Wiltbank *et al.*, 1965; Macmillan e Peterson, 1993; Cavestany *et al.*, 2003). A P4 atua na preparação do útero para uma possível futura gestação e sensibilização do hipotálamo, hipófise e ovários, para respostas à gonadotropinas. Quando fornecida via dispositivos de liberação lenta (de 5 a 10 dias, variação conforme protocolo), a P4

exógena induz um *feedback* negativo no estradiol, assim inibindo a onda de LH, coibindo o estro e a ovulação (Baruselli *et al.*, 2004).

A concentração plasmática de P4, é definida pela produção endógena, catabolismo e uma possível fonte exógena, sendo que a metabolização é hepática, então podendo os níveis de P4 no organismo variarem conforme espécie e categoria trabalhada (Gomes *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2013; Wiltbank *et al.*, 2018). Vacas que possuem uma maior ingestão de matéria seca, aumentam a metabolização hepática devido ao aumento de fluxo sanguíneo, assim reduzindo a circulação de hormônios esteroides (Vasconcelos *et al.*, 2009). As concentrações séricas de P4 variam conforme subespécies trabalhadas, 4,5 ng/mL e 16 ng/mL os valores máximos, em animais zebuínos e taurinos, respectivamente (Adeyemo e Heath, 1980; Badinga *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 2000). A redução da concentração de P4 circulante durante o início do diestro, reduz a taxa de concepção em novilhas e vacas (Mann e Lamming, 1999; Stronge *et al.*, 2005; Diskin e Morris, 2008). A sobrevivência e desenvolvimento do embrião são diretamente proporcionais a expressão gênica endometrial e a concentração circulante de P4 (Inskeep, 2004).

Recentemente, uma nova apresentação de P4 para utilização na indução de ciclicidade foi desenvolvida (Simões *et al.*, 2018). O produto é uma P4 injetável de longa ação (iP4), administrada via intramuscular e de dose única. Comparado com os dispositivos intravaginais convencionais, favorece o manuseio do produto, facilitando a aplicação e acelerando o manejo comercial em propriedades pecuárias.

Em sistemas onde novilhas de 14 meses já são utilizadas para sincronização e posterior inseminação artificial (IA), o uso da P4 é essencial. Com a iP4, facilita-se o manejo desses animais jovens, realizando uma aplicação prévia ao início do protocolo de IATF. Porém, os efeitos da iP4 no trato reprodutivo de novilhas taurinas carece de ser esclarecido.

O objetivo do presente estudo é, (1) determinar o efeito da iP4 na indução da puberdade em novilhas taurinas, e (2) determinar se a aplicação de iP4 afeta a taxa de prenhez entre animais púberes e não púberes.

### **3.1.2 Metodologia**

O experimento foi realizado nos meses de novembro e dezembro de 2020, em uma propriedade comercial de bovinos de corte, localizadas na região sul do estado

do Rio Grande do Sul. As fêmeas taurinas (n = 70) com idade aproximada de 14 meses e peso médio de 318,07 kg (280 – 397 kg) foram mantidas em pastagem cultivada e com acesso *ad libitum* a água e sal mineral. Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram autorizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Parecer 160/2020/CEEA/REITORIA).

O estudo foi dividido em fase de indução e a fase de sincronização. A fase de indução iniciou-se 24 dias (D-24) antes do início do protocolo de IATF, onde, através de palpação retal foi determinado se os animais eram púberes (PUB), ou não púberes (NPUB) (Holm et al., 2009) e, a partir dessa avaliação receberam (iP4) ou não (NiP4) formando quatro grupos experimentais: PUB|iP4 (n= 27), NPUB|iP4 (n= 8), PUB|NiP4 (n= 28) e NPUB|NiP4 (n= 7). Os animais dos grupos iP4 receberam uma injeção IM de 150 mg de P4 de longa duração (Sincrogest, Ourofino Saúde Animal), Dez dias após a avaliação inicial (D-14), todos animais receberam 0,5 mg de cloprostenol (2,0 mL, IM, Sincrocio, Ourofino Saúde Animal) e os animais que observou-se manifestação de estro foram submetidos a IA 12 horas após a observação. O sistema de inseminação com observação de cio foi mantido por 10 dias. Os animais que não foram inseminados foram submetidos a um protocolo de IATF (D0), com colocação do dispositivo intravaginal (DIV) (Primer, Tecnopec) de P4 e aplicação IM de 2 mg de benzoato de estradiol (2,0 mL, IM, Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal). No D8, na retirada do DIV, foi realizada a aplicação de 0,5 mg de cloprostenol, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (1,0 mL, IM, Sincro eCG, Ourofino Saúde Animal) e 1 mg de cipionato de estradiol (1,0 mL, IM, SincroCP, Ourofino Saúde Animal). Os animais foram marcados com tinta específica (Celocheck, Weizur) na base da cauda, visando a verificação de manifestação de cio. A IATF foi realizada no D10. Nesse momento, os animais que ainda estavam com tinta indicadora, receberam 10,5 µg de acetato de buserelina (2,5 mL, IM, Gonaxal, Biogénesis Bago).

O diagnóstico de gestação foi realizado com o auxílio de ultrassonografia (A5V, SonoScape Medical Corp), utilizando uma probe transretal linear de 7.5 MHz no dia 78 após a IATF. A análise dos resultados foi realizada através de chi-quadrado.

### 3.1.3 Resultados e discussão

Os animais utilizados no experimento pesaram, em média, 318,07 kg (280 - 397 kg), sendo a média dos grupos púberes (PUB) e pré-púberes (PRE) 321,69 e 304,80 kg, respectivamente.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros avaliados, assim sendo, a iP4, utilizada 24 dias antes do protocolo de IATF, não foi capaz de melhorar os índices de prenhez dos animais pré-púberes. A taxa de manifestação de estro, ou seja, de animais submetidos a IA após observação de estro, foi de 30,9% para os animais PUB e 6,7% para os animais PRE ( $P = 0,056$ ), independente de terem ou não recebido iP4. A taxa de prenhez da IATF, considerando animais PRE e PUB, independente de terem ou não recebido iP4 foi de 66,7% e 75,9%, respectivamente, mostrando que a técnica aplicada foi eficaz para engravidar um percentual elevado de animais no início da vida reprodutiva. Diferentemente do relatado por De Lima e colaboradores (2020), a iP4 não foi capaz de melhorar a taxa de estro e prenhez em animais pré-púberes.

**Tabela 1.** Desempenho reprodutivo de novilhas submetidas a protocolo de indução de puberdade, IA e IATF subsequente durante estação reprodutiva.

	Peso		IA (%)**	IATF (%)***	Prenhez IA (%)	Prenhez IATF (%)	Prenhez total (%)
	Médio Inicial (Kg)	GMD* (Kg)					
<b>PUB iP4</b> (n= 27)	320,2	0,43	25,9 (7/27)	74,1 (20/27)	42,9 (3/7)	55,0 (11/20)	51,8 (14/27)
<b>PRE iP4</b> (n= 9) <sup>‡</sup>	304,4	0,51	0 (0/9)	88,9 (8/9)	-	75,0 (6/8)	66,7 (6/9)
<b>PUB niP4</b> (n= 28) <sup>‡</sup>	323,1	0,45	35,7 (10/28)	57,1 (16/28)	80,0 (8/10)	68,7 (11/16)	67,9 (19/28)
<b>PRE niP4</b> (n= 6)	305,3	0,53	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)	100 (1/1)	40,0 (2/5)	50,0 (3/6)
<b>Média</b>	318,0	0,48	25,7	74,3	75,0	73,2	73,7

\* GMD – Ganho Médio Diário dos animais desde o primeiro dia do experimento até o diagnóstico de gestação;

\*\* IA – Inseminação Artificial realizada após observação de estro, 10 dias após a aplicação de iP4

\*\*\* IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo realizada nos animais que não foram submetidos a IA.

Não houve diferença estatística em nenhum dos índices analisados.

<sup>‡</sup> Diferença na soma dos grupos. O experimento foi realizado em uma propriedade comercial e no momento do diagnóstico alguns animais não estavam presentes.

Os animais do grupo PRE|iP4 não manifestaram estro inicialmente, entretanto obteve-se uma taxa de prenhez de 75% (6/8) na IATF nesse grupo, uma taxa de valor absoluto maior quando comparado ao grupo PRE|niP4 (40%, 2/5), não havendo uma diferença estatística significativa, podendo isso ser devido ao baixo número de animais pré-púberes do experimento. Diversos autores, trabalhando com animais *Bos indicus*, demonstraram a capacidade de indução a ciclicidade da P4 (Anderson *et al.*, 1996; Júnior *et al.*, 2010; Patterson *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Sá Filho *et al.*, 2015). Fisiologicamente, a exposição prévia a P4 reduz a sensibilidade do hipotálamo

a retroalimentação negativa de estradiol dos folículos nos ovários, aumentando os pulsos de LH, crescimento folicular e posterior ovulação (Anderson *et al.*, 1996).

A taxa final de prenhez, para animais pré-púberes foi de 69,2% e para os animais púberes foi de 75,0%. Esses resultados mostram que o trato reprodutivo desses animais possuíam competências semelhantes, sendo que a maturidade deve ser atingida previamente ao protocolo de IATF ou sincronização (Thomas *et al.*, 2017). Esse fato está provavelmente relacionado com o GMD médio de 0,48 Kg mantido por esses animais durante o período experimental, o que deve ter proporcionado o atingimento da puberdade pelos animais que iniciaram o experimento ainda sem essa condição.

### **3.1.4 Conclusão**

Nas condições do presente estudo, a utilização da progesterona injetável de longa ação não se mostrou eficiente para indução da puberdade em fêmeas bovinas taurinas. A taxa de prenhez de animais púberes ou não, foi similar quando utilizada a progesterona injetável de longa ação prévia a sincronização de estro. Novos estudos com um maior número de animais serão realizados para inferir resultados com maior intervalo de confiança.

## 3.2 Experimento 2

### 3.2.1 Introdução

O aumento na demanda e o déficit de oferta de produtos derivados de ovinos tem resultado na valorização dos animais, estimulando o crescimento do rebanho (IBGE, 2019). Esse crescimento gera a necessidade da otimização do sistema produtivo, o que pode ser obtido com o emprego de biotecnologias para manipulação do ciclo estral, contornando o problema de entressafra determinado pela sazonalidade reprodutiva. As fêmeas ovinas são poliéstricas estacionais, sendo que a estação reprodutiva ocorre no período de decréscimo das horas de luz do dia (Boland *et al.*, 1990; Da Fonseca, 2005). Porém, durante o período fora da estação reprodutiva (anestro fisiológico), pode-se realizar a indução de ciclicidade mediante regimes de manejo de luminosidade para induzir liberação de melatonina ou utilização de tratamentos hormonais a base progestágenos associados a gonadotrofinas e prostaglandinas (Da Fonseca, 2005; Simplício *et al.*, 2007).

Protocolos hormonais para controle do ciclo estral podem ser base de diferentes hormônios, entretanto, o método que utiliza progesterona como base não necessita que os animais possuam CL. Como nos bovinos, o meio mais comum de utilização da progesterona em ovinos é por dispositivos intravaginas. Esse produto apresenta bons resultados e controle dos níveis de progesterona circulante nos animais (Souza, 2013). A progesterona é um hormônio que desempenha a função de regulação no sistema reprodutor, sendo efetiva em baixas concentrações e sintetizada por ovários e placenta, sendo assim desempenhando sua função conforme a fase do ciclo estral do animal (Lehninger, 2006).

Apesar de progestágenos de uso oral e P4 injetável já estarem disponível há bastante tempo, a necessidade de fornecimento diário tornou seu uso oneroso. O uso de diferentes formulações de P4 de longa duração já foi utilizado em ovinos com diferentes objetivos e resultados (Almeida *et al.*, 2005; Toma, 2009; Bretanha *et al.*, 2019). Porém, recentemente, uma nova apresentação de progesterona injetável de longa ação (iP4) chegou ao mercado, podendo representar uma alternativa aos DIVs devido a maior facilidade de aplicação e manejo, além do menor custo. Outros autores já utilizaram diferentes formas de progesteronas injetáveis, além disso, os resultados encontrados em literatura serem contraditórios. Diante do exposto, no presente

estudo, foi utilizada uma nova apresentação de progesterona injetável sendo, conseqüentemente, necessário avaliar diferentes doses e intervalos de aplicação.

Dados de experimentos anteriores, ainda não publicados, sugerem que no D7 após a aplicação de 75 mg de P4i, o nível sérico médio de P4 nos animais está acima de 1ng/mL. Assim sendo, visando comparar a viabilidade da substituição do dispositivo intravaginal com medroxiprogesterona-MAP por progesterona injetável em um programa para indução de estro em ovelhas, o objetivo do presente estudo foi estudar o efeito da aplicação de eCG 9 e 10 dias após a aplicação de 75 mg de P4i nos animais.

### 3.2.2 Metodologia

O experimento foi realizado no Centro Agropecuário da Palma – CAP/UFPeI (31° 46' 53,41703"S e 52° 28' 40,62814"W), localizado na região sul do estado do Rio Grande do Sul, nos meses de novembro e dezembro, ou seja, transição da estação de primavera/verão no hemisfério sul, período de anestro sazonal dos animais. Foram utilizadas ovelhas cruzadas (n = 36), com acesso a pastagem nativa e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram autorizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Parecer 160/2020/CEEA/REITORIA).

No início do experimento (dia 0; D0), os animais foram pesados para distribuição homogênea dos animais em dois grupos : Controle – inserção de DIV impregnado com 60 mg de MAP (n=10; peso médio = 46,6kg); Tratamento - injeção IM de 75 mg de P4i (Sincrogest injetável®, Ourofino) (n=26; peso médio = 48kg). No D9 os DIV do grupo controle foram removidos e todos os animais receberam uma injeção IM de 300 UI de eCG (Sincro eCG, Ourofino Saúde Animal). Os animais do grupo tratamento foram divididos em dois sub-grupos (n=13), onde um recebeu injeção IM de 300 UI de eCG também no D9 (iP4D9) e outro no D10 (iP4D10). No período de D11 a D13, todas as ovelhas permaneceram com carneiros (n=4) de capacidade reprodutiva conhecida. Para contabilização do momento e número de animais em estro, os carneiros tiveram a região esternal impregnada por substância marcadora (pigmento e gordura). O registro das ovelhas marcadas foi realizado a cada 12 horas.

Quarenta dias após a remoção dos carneiros (D53), foi realizado diagnóstico de gestação por ultrassonografia transvaginal (A5V, SonoScape Medical Corp) utilizando probe convexa de 5 MHz.

### 3.2.3 Resultados e discussão

Considerando que não houve diferença estatísticas nos dados avaliados entre os grupos que receberam iP4, os resultados serão descritos de forma unificada. A taxa de manifestação de estro foi inferior ( $P < 0,001$ ) no Tratamento (26,92%; 7/26) comparado ao grupo controle (90%; 9/10). As taxas de manifestação de estro e prenhez foram inferiores ( $P < 0,001$ ), no grupo tratamento em relação ao controle (Tabela 2). A taxa de concepção também foi inferior ( $P = 0,048$ ) nos animais que receberam P4i.

**Tabela 2.** Desempenho reprodutivo de ovelhas submetidas a protocolo de indução de ciclicidade durante anestro sazonal com dispositivo intravaginal impregnado com 60 mg de MAP ou injeção de progesterona de longa duração (iP4).

Grupo	n	Peso (kg)	Estro (%)	Prenhez (%)	Concepção (%)
Controle	10	48	90 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	88,9 <sup>a</sup>
iP4	26	46,57	26,9 <sup>b</sup>	11,5 <sup>b</sup>	42,9 <sup>b</sup>

As proporções nos diferentes grupos foram comparadas através do teste de qui-quadrado. Letras distintas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Conforme relatado por outros autores os DIV são efetivos em sincronizar o estro em ovelhas. Utilizando esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de MAP por 14 dias e administração de 375 UI de eCG na retirada das esponjas, resultou em 92% de fêmeas demonstrando estro no período de 72 horas (Simonetti *et al.*, 1999). Ao utilizar DIVs impregnados por MAP por 9 ou 14 dias, a manifestação de estro foi de 69% e 80%, respectivamente. Sendo que as taxas de prenhez e concepção foram de 34% e 44%, e 50% e 55%, nos respectivos grupos (Castilho *et al.*, 2013). No presente estudo a taxa de manifestação de estro pelo grupo controle foi similar aos citados anteriormente.

Um estudo comparou diferentes protocolos de sincronização utilizando progesterona injetável de longa ação (P4-300, 300 mg/mL, Botupharma). Ambos grupos receberam 300 mg de P4-300 no D0. Um dos grupos teve o protocolo com cinco dias de duração, então recebendo no D5, 280 UI de eCG e 150 µg de cloprostenol. O segundo grupo, teve um protocolo de seis dias, sendo que recebeu no D3 uma segunda dose de P4-300, igual ao do D0, e então recebendo os mesmos hormônios do outro grupo no D5. O estudo observou que a progesterona injetável de longa ação não foi eficiente em sincronizar o estro (Bretanha *et al.*, 2019), o que corrobora com os achados deste estudo, apesar de termos aplicado eCG em intervalos maiores após a aplicação de P4i.

A P4 altera a função ovariana, inibindo o estro e a ovulação (Savio *et al.*, 1993). A taxa de crescimento folicular diminui se utilizado doses de P4 exógena que eleve muito o nível circulante (Rubianes *et al.*, 1996), o que pode ter efeitos indesejáveis no grupo que recebeu a apresentação injetável, por a via intramuscular ser uma via de absorção mais rápida (Spinosa *et al.*, 1999). Possivelmente pela decorrência de níveis residuais de P4 no grupo que recebeu a iP4, essas ovelhas podem ter ovulado sem manifestação de estro, o que ainda será avaliado.

### **3.2.4 Conclusão**

A utilização da nova apresentação de progesterona injetável de longa ação não se mostrou eficiente para promover a sincronização de estro em ovelhas fora da estação reprodutiva. Novos protocolos serão avaliados em estudos futuros.

#### **4 Considerações finais**

Como foi revisado no primeiro artigo, nenhum método de aumentar a criotolerância dos embriões equinos grandes mediante redução de seu volume pelo colabamento de blastocele usando técnicas manuais havia sido descrito. Conforme proposto, o procedimento foi executado em condições de campo, permitindo a obtenção do colabamento. Entretanto, as taxas de prenhez obtidas a partir dos embriões submetidos ao procedimento e vitrificados, não foi satisfatória. Dessa forma, novas abordagens simplificadas devem ser testadas para estabelecer uma metodologia prática e eficiente.

Na dose e momento escolhidos no estudo, a utilização da nova formulação de progesterona injetável de longa ação não proporcionou a obtenção de aumento nas taxas de prenhez em novilhas *Bos taurus* e também não foi eficiente na indução de estro e obtenção de prenhez em ovelhas tratadas fora da estação reprodutiva. São necessários novos estudos avaliando novas doses e momentos de aplicação da iP4 e dos outros componentes dos protocolos de indução e sincronização de onda folicular.

## Referências

- ADEYEMO, O.; HEATH, E. **Plasma progesterone concentration in Bos taurus and Bos indicus heifers**. Theriogenology, v. 14, n. 6, p. 411-420, 1980. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X80900527> >.
- ALLEN, W. R.; ROWSON, L. E. **Surgical and non-surgical egg transfer in horses**. Journal of Reproduction and Fertility Supplements, n. 23, p. 525-30, Oct 1975. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1060836/> >.
- ALMEIDA, A. K. et al. **Concentração sérica de progesterona em ovelhas ovariectomizadas tratadas com progesterona de longa ação (P4-LA)**. Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, p. 242, 2005. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/actavet/33-1/033-1.htm> >.
- ALVAREZ, P. et al. **Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment**. Journal of Animal Science, v. 78, n. 5, p. 1291-1302, 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.2527/2000.7851291x> >. Acesso em: 2/23/2021.
- ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. **Progestin-Induced Puberty and Secretion of Luteinizing Hormone in Heifers**. Biology of Reproduction, v. 54, n. 5, p. 1025-1031, 1996. Disponível em: < <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.5.1025> >. Acesso em: 3/6/2021.
- ARAV, A.; SHEHU, D.; MATTIOLI, M. **Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes**. Reproduction, v. 99, n. 2, p. 353-358, 1993. Disponível em: < [https://rep.bioscientifica.com/downloadpdf/journals/rep/99/2/jrf\\_99\\_2\\_010.xml](https://rep.bioscientifica.com/downloadpdf/journals/rep/99/2/jrf_99_2_010.xml) >.
- BADINGA, L. et al. **Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$ , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows**. Theriogenology, v. 42, n. 8, p. 1263-1274, 1994. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9490246F> >.
- BARFIELD, J. P. et al. **Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos**. Cryobiology, v. 59, n. 1, p. 36-41, Aug 2009. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224009000364?via%3Dihub> >.
- BARUSELLI, P. S. et al. **Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise retrospectiva)**. Acta Scientiae Veterinariae, v. 32, p. 228, 2004. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/actavet/32-suple/ANAIS%20SBTE-2004%20-%20Palestra-Resumos.pdf> >.

- BASS, L. D. et al. **Methanol as a cryoprotectant for equine embryos.** Theriogenology, v. 62, n. 6, p. 1153-1159, 2004/09/15/ 2004. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04000822> >.
- BATTUT, I. et al. **Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation.** Equine Veterinary Journal Supplements, n. 25, p. 60-2, Dec 1997. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9593530/> >.
- BEST, B. P. **Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions.** Rejuvenation Res, v. 18, n. 5, p. 422-36, Oct 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826677> >.
- BETTERIDGE, K. J. et al. **Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens.** Journal of anatomy, v. 135, n. Pt 1, p. 191-209, 1982. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7130052> >.
- BETTERIDGE, K. **The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer.** Equine Veterinary Journal, v. 21, p. 92-100, 06/10 2010. Disponível em: < <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04690.x> >.
- BOLAND, M.; CROSBY, F.; OCALLAGHAN, D. **ARTIFICIAL CONTROL OF THE BREEDING-SEASON IN EWES.** Irish Veterinary Journal, v. 43, n. 1, p. 2-6, 1990.
- BREDBACKA, P.; KANKAANPAA, A.; PEIPPO, J. **PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol.** Theriogenology, v. 44, n. 2, p. 167-76, Jul 15 1995. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16727716/> >.
- BRETANHA, I.; CARVALHO, C. V. D.; NASCIMENTO, M. C. **Efeito da progesterona exógena injetável em protocolos de sincronização em ovinos.** PUBVET, v. 13, p. 153, 2019. Disponível em: < <http://www.pubvet.com.br/uploads/4c38e527b8d715a61330e392ad923f12.pdf> >.
- CARNEVALE, E. M. et al. **Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer.** Theriogenology, v. 54, n. 6, p. 965-979, 2000/10/01/ 2000. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00004052> >.
- CARNEVALE, E. M. **Vitrification of equine embryos.** Vet Clin North Am Equine Pract, v. 22, n. 3, p. 831-41, Dec 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129806> >.
- CASTILHO, C. et al. **Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas.** Ciência Animal Brasileira, v. 14, p. 91-97, 2013. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1809-68912013000100012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912013000100012&nrm=iso) >.
- CAVESTANY, D. et al. **Use of medroxyprogesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal**

**patterns.** Theriogenology, v. 59, n. 8, p. 1787-1798, 2003/04/15/ 2003. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0201230X> >.

CHOI, Y. H. et al. **Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis.** Reproduction, v. 140, n. 6, p. 893-902, Dec 2010. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20843896/> >.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. **Small day 8 equine embryos cannot be rescued by a less advanced recipient mare uterus.** Theriogenology, v. 126, p. 36-40, 2019/03/01/ 2019. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18304606> >.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. **Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer.** The Veterinary Record, v. 183, n. 10, p. 323, Sep 15 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29798842/> >.

DA FONSECA, J. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2005, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. Anais ....

DAY, M.; NOGUEIRA, G. **Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production.** Animal Frontiers, v. 3, p. 6-11, 09/26 2013. Disponível em: < <https://academic.oup.com/af/article-pdf/3/4/6/32410297/6.pdf> >.

DE LIMA, R. S. et al. **Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI.** Theriogenology, v. 154, p. 128-134, 2020/09/15/ 2020. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20303265> >.

DE, K. et al. **Estrus synchronization and fixed-time artificial insemination in sheep under field conditions of a semi-arid tropical region.** Tropical Animal Health and Production, v. 47, n. 2, p. 469-472, 2015/02/01 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0735-x> >.

DIAZ, F. et al. **Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification.** Theriogenology, v. 85, n. 5, p. 894-903, Mar 15 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X15006044?via%3Di> hub >.

DIAZ, F. et al. **Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification.** Theriogenology, v. 85, n. 5, p. 894-903, Mar 15 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X15006044?via%3Di> hub >.

DISKIN, M.; MORRIS, D. **Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants**. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n. s2, p. 260-267, 2008. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x> >.

DOBRINSKY, J. R. **Cellular approach to cryopreservation of embryos**. *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 17-26, 1996/01/01/ 1996. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X95003518> >.

ELDRIDGE-PANUSKA, W. D. et al. **Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos**. *Theriogenology*, v. 63, n. 5, p. 1308-19, Mar 15 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04002560> >.

FAHY, G. M. **The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology**. *Cryobiology*, v. 23, n. 1, p. 1-13, Feb 1986. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0011224086900131> >.

FAHY, G. M.; LEVY, D. I.; ALI, S. E. **Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions**. *Cryobiology*, v. 24, n. 3, p. 196-213, Jun 1987. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/001122408790023X> >.

FERRIS, R. A. et al. **Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse**. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 41, p. 64-65, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073708061630171X> >. Acesso em: 2018/12/11.

GOMES, N.; NEVES, M.; MICHELINI, R. **Nutrição e reprodução em vacas leiteiras**. 2009. Disponível em: < <http://cba.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/p118-124.pdf> >.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H. **Micromanipulation of equine blastocysts to allow vitrification**. *Reproduction, Fertility and Development*, Feb 25 2016. Disponível em: < <https://www.publish.csiro.au/RD/RD15389> >.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H. **Micromanipulation of equine blastocysts to allow vitrification**. *Reproduction, Fertility and Development*, Feb 25 2016. Disponível em: < <https://www.publish.csiro.au/RD/RD15389> >.

HOLT, W. V. **Basic aspects of frozen storage of semen**. *Anim Reprod Sci*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, Aug 18 2000. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432000001524> >.

INSKEEP, E. K. **Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow<sup>1,2</sup>**. *Journal of Animal Science*, v. 82, n. suppl\_13, p. E24-E39, 2004. Disponível em: < [https://doi.org/10.2527/2004.8213\\_supplE24x](https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE24x) >. Acesso em: 2/18/2021.

- JACOB, J. C. et al. **Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program.** Theriogenology, v. 77, n. 6, p. 1159-66, Apr 1 2012. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X11005371?via%3Dihub> >.
- JÚNIOR, I. C. et al. **Reproductive performance of prepubertal Bos indicus heifers after progesterone-based treatments.** Theriogenology, v. 74, n. 6, p. 903-911, 2010/10/01/ 2010. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10002220> >.
- LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; GARDNER, D. K. **Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique.** Fertil Steril, v. 72, n. 6, p. 1073-8, Dec 1999. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0015028299004185> >.
- LOPEZ, E.; CIPRI, K.; NASO, V. Technologies for Cryopreservation: Overview and Innovation. In: (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**, 2012. cap. Chapter 11, ISBN 978-953-51-0191-8.
- MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. **A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus.** Animal Reproduction Science, v. 33, n. 1, p. 1-25, 1993/10/01/ 1993. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209390104Y> >.
- MANN, G.; LAMMING, G. **The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle.** Reproduction in Domestic Animals, v. 34, n. 3-4, p. 269-274, 1999. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01250.x> >.
- MCCUE, P. M. et al. **Embryo recovery procedures and collection success: results of 492 embryo-flush attempts.** Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, v. 56, p. 318-321, 2010. Disponível em: < <https://aaep.org/sites/default/files/issues/proceedings-10proceedings-z9100110000318.pdf> >.
- MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. **Equine embryo transfer.** CRC Press, 2015. 184p ISBN 1498734766. Disponível em: < <https://vetbooks.ir/equine-embryo-transfer/> >.
- MCLELLAN, M. R.; DAY, J. G. **Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction.** Methods Mol Biol, v. 38, p. 1-5, 1995.
- MOROTTI, F. et al. **Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef cows.** Animal reproduction, v. 15, n. 1, p. 17-22, 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33365090> >.
- MOUSSA, M. et al. **In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification.**

Theriogenology, v. 64, n. 7, p. 1619-32, Oct 15 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907992> >.

MUKAIDA, T. et al. **Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts.** Hum Reprod, v. 21, n. 12, p. 3246-52, Dec 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936299> >.

NIEMANN, H. J. T. **Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs.** v. 35, n. 1, p. 109-124, 1991. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X91901513> >.

OBERSTEIN, N. et al. **Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods.** Theriogenology, v. 55, n. 2, p. 607-13, Jan 15 2001. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X01004290> >.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. **Non-surgical egg transfer in mares.** J Reproduction, v. 41, n. 2, p. 313-320, 1974. Disponível em: < [https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/41/2/jrf\\_41\\_2\\_007.xml](https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/41/2/jrf_41_2_007.xml) >.

PAPADOPOULOS, S. et al. **Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts.** Anim Reprod Sci, v. 74, n. 1-2, p. 35-44, 2002. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432002001628> >.

PATTERSON, D. J. et al. **Control of Estrus and Ovulation in Beef Heifers.** Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 29, n. 3, p. 591-617, 2013/11/01/ 2013. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072013000613> >.

ROCHA, D. C. **Utilização de progesterona injetável de longa ação no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas de corte.** 2011. Disponível em: < [https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/94702/000915626.pdf?sequence=1&locale-attribute=pt\\_BR](https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/94702/000915626.pdf?sequence=1&locale-attribute=pt_BR) >.

RODRIGUES, A. D. P. et al. **Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nellore heifers.** Theriogenology, v. 79, n. 1, p. 135-141, 2013/01/01/ 2013. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X12005365> >.

RUBIANES, E.; CASTRO, T. D.; CARBAJAL, B. **Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes.** Canadian Journal of Animal Science, v. 76, n. 3, p. 473-475, 1996. Disponível em: < <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.4141/cjas96-071> >.

SÁ FILHO, M. F. et al. **Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of Bos indicus beef heifers.** *Animal Reproduction Science*, v. 160, p. 30-39, 2015/09/01/ 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015001554> >.

SANCHEZ, R. et al. **Influence of Embryonic Size and Manipulation on Pregnancy Rates of Mares After Transfer of Cryopreserved Equine Embryos.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 49, p. 54-59, 2017/02/01/ 2017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616304592> >.

SAVIO, J. et al. **Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle.** *Reproduction*, v. 98, n. 1, p. 77-84, 1993. Disponível em: < [https://rep.bioscientifica.com/downloadpdf/journals/rep/98/1/jrf\\_98\\_1\\_010.pdf](https://rep.bioscientifica.com/downloadpdf/journals/rep/98/1/jrf_98_1_010.pdf) >.

SCHERZER, J. et al. **A new approach to cryopreservation of large equine embryos by vitrification after blastocoel micromanipulation.** *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, n. 1, p. 225-226, 2007. Disponível em: < <https://www.publish.csiro.au/rd/rdv19n1ab217> >.

SCHERZER, J.; DAVIS, C.; HURLEY, D. J. **Laser-assisted vitrification of large equine embryos.** *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 6, p. 1104-6, Dec 2011. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2011.01795.x> >.

SCOTT, B. R. et al. **Evaluation of Capsule Permeability in the Equine Blastocyst.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 32, n. 12, p. 795-798, 2012/12/01/ 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612001402> >.

SIMÕES, L. M. S. et al. **Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled Bos indicus cows.** *Theriogenology*, v. 116, p. 28-33, 2018/08/01/ 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18301766> >.

SIMONETTI, L.; RAMOS, G.; GARDÓN, J. C. **Estrus presentation and distribution in ewes treated with intravaginal sponges impregnated with medroxyprogesterone acetate (MAP) in combination with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG).** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, p. 00-00, 1999. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-95961999000500002&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000500002&nrm=iso) >.

SIMPLÍCIO, A.; FREITAS, V. D. F.; DA FONSECA, J. **Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos.** Embrapa Caprinos e Ovinos, 2007. Disponível em: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/532668/1/APIBiotecnicasdereproducao.pdf> >.

SLADE, N. P. et al. **A new procedure for the cryopreservation of equine embryos.** Theriogenology, v. 24, n. 1, p. 45-58, Jul 1985. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X85902110> >.

SOUZA, M. **Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 37, n. 2, p. 220-225, 2013. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/profile/Maria\\_Souza24/publication/275519990\\_Inducao\\_e\\_sincronizacao\\_de\\_estro\\_em\\_ovellas\\_desafios\\_e\\_potencial/links/553e392b0cf294deef6fca8f.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Maria_Souza24/publication/275519990_Inducao_e_sincronizacao_de_estro_em_ovellas_desafios_e_potencial/links/553e392b0cf294deef6fca8f.pdf) >.

SPINOSA, H. D. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 1999.

STOUT, T. A. **Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art.** Reprod Domest Anim, v. 47 Suppl 3, p. 84-9, Jun 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681302> >.

STOUT, T. A.; 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. 269-81, Jul 2005. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432004002532?via%3Dihub> >.

STRONGE, A. J. H. et al. **Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows.** Theriogenology, v. 64, n. 5, p. 1212-1224, 2005/09/15/ 2005. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05000610> >.

THOMAS, J. M. et al. **Evaluation of the 14-d CIDR-PG and 9-d CIDR-PG protocols for synchronization of estrus in Bos indicus-influenced and Bos taurus beef heifers.** Theriogenology, v. 92, p. 190-196, 2017/04/01/ 2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17300316> >.

TOMA, C. D. M. **Bioestimulação em fêmeas ovinas submetidas à administração exógena de acetato de medroxiprogesterona ou progesterona de longa ação na pré-puberdade.** 2009. Disponível em: < [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98142/monteiro\\_cd\\_me\\_botfmvz.pdf?sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98142/monteiro_cd_me_botfmvz.pdf?sequence=1) >.

ULBERG, L. C.; CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E. **Ovarian Response in Heifers to Progesterone Injections<sup>1</sup>.** Journal of Animal Science, v. 10, n. 3, p. 752-759, 1951. Disponível em: < <https://doi.org/10.2527/jas1951.103752x> >. Acesso em: 2/18/2021.

VAJTA, G. et al. **Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.** Mol Reprod Dev, v. 51, n. 1, p. 53-8, Sep

1998. Disponível em: < [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199809\)51:1%3C53::AID-MRD6%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1%3C53::AID-MRD6%3E3.0.CO;2-V) >.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. **Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification.** *Reprod Biomed Online*, v. 12, n. 6, p. 779-96, Jun 2006. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648310610917> >.

VANDERZWALMEN, P. et al. **Survival of Metaphase II Oocytes (MII) and Blastocysts After Vitrification in a Hemi-Straw (HS) System.** *Fertility and Sterility*, v. 74, n. 3, p. S215-S216, 2000. Disponível em: < [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(00\)01358-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(00)01358-3/fulltext) >. Acesso em: 2019/06/03.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. **Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrus crossbred Angus x Nelore cows.** *Animal Reproduction Science*, v. 111, n. 2-4, p. 302-311, 2009. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432008001024> >.

WEISS, J. et al. **Comparison between an open and a closed vitrification system for equine forced-collapsed embryos.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 41, p. 52-53, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080616301459?via%3Dihub> >. Acesso em: 2018/12/11.

WESTH, P. **Preferential interaction of dimethyl sulfoxide and phosphatidyl choline membranes.** *Biochim Biophys Acta*, v. 1664, n. 2, p. 217-23, Aug 30 2004. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273604001336> >.

WILSHER, S. et al. **Puncture of the Equine Embryonic Capsule and Its Repair In Vivo and In Vitro.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 93, p. 103194, 2020/10/01/ 2020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080620302859> >.

WILSHER, S. et al. **Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid.** *Equine Veterinary Journal*, Nov 12 2018. Disponível em: < <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.13039> >.

WILSHER, S.; RIGALI, F.; ALLEN, W. R. **Pregnancy rates after manual puncture of equine embryos following direct transfer or vitrification.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 89, p. 103060, 2020/06/01/ 2020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080620301519> >.

WILTBANK, J. N. et al. **Use of Progestational Compounds Alone or in Combination with Estrogen for Synchronization of Estrus.** *Journal of Animal Science*, v. 24, n. 4, p. 990-994, 1965. Disponível em: < <https://doi.org/10.2527/jas1965.244990x> >. Acesso em: 2/18/2021.

WILTBANK, M. et al. **Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle.** *Animal Reproduction*, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2018. Disponível em: < <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6057f7783717068b46e3> >.

## **Anexos**

## Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



**PARECER Nº**  
**PROCESSO Nº**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**110/2018/CEEA/REITORIA**  
23110.046202/2018-93

Pelotas, 16 de outubro de 2018

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Indução manual de colabamento de embriões equinos para melhorar sua criotolerância**” processo número 23110.046202/2018-03, de responsabilidade de Rafael Gianella Mondadori- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 15/10/2018.

Finalidade	( X ) Pesquisa      ( ) Ensino
Vigência da autorização	01/11/2018 a 01/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Equina/SRD
Nº de animais	11
Idade	3-15 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Centro Agropecuário da Palma - UFPel

Código para cadastro CEEA 46202-2018

## Anexo II - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



**PARECER N°** 160/2020/CEEA/REITORIA  
**PROCESSO N°** 23110.031587/2020-17

### Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Alternativas para o controle do ciclo estral de bovinos e ovinos.”, registrada com o nº 23110.031587/2020-17, sob a responsabilidade de **Rafael Gianella Mondadori** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 08 de dezembro de 2020.

Finalidade	( x ) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	01/01/2021 a 30/12/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Ovis aries</i> – raças comerciais e cruzas <i>Bos taurus</i> – raças comerciais e cruzas
Nº de animais	486 ovinos 688 bovinos
Idade	ovinos - 12 a 60 meses bovinos - 12 a 96 meses
Sexo	ovinos - 26 machos e 460 fêmeas bovinos - 688 fêmeas
Origem	Centro Agropecuário da Palma - UFPel Propriedades particulares

Código para cadastro nº CEEA 31587-2020