

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA INTEGRADAS À MEDICINA VETERINÁRIA
PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

AGNELO DOUGLAS DO NASCIMENTO JÚNIOR

Influência do bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase em blastocistos equinos

VIÇOSA-AL
2018

AGNELO DOUGLAS DO NASCIMENTO JÚNIOR

Influência do bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase em blastocistos equinos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Polo Viçosa
Bibliotecária Responsável: Edvânia C. S. Gonçalves

N244I Nascimento Junior, Agnelo Douglas do
Influência do bloqueio da Na⁺, K⁺-ATPase em blastocistos
equinos/ Agnelo Douglas do Nascimento Junior – 2018.

61 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas,
Centro de Ciências Agrárias, Viçosa-AL, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara

Inclui bibliografia

1. Equinos 2. Embriologia veterinária 3. Blastocistos I. Título
CDU:636.1:591.3

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, e aos meus saudosos, avô materno José Galdino Vieira e avó paterna Maria Lima do Nascimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me proporcionou esta oportunidade nesta vida terrena, poder produzir algo eterno. É bem verdade que sem a presença viva de seu filho Jesus e intercessão de Nsa. Senhora, só com as minhas forças eu nada produziria, nada seria.

Agradeço a meus pais Tereza e Agnelo, todo o apoio, paciência, compreensão e esforços que são fundamentais para que eu consiga tomar sempre as minhas decisões, pessoais e profissionais. A meus queridos irmãos, Agnes e Saulo que sempre se orgulharam em ver meu desempenho em tudo o que faço. Vocês são para mim especiais e vitoriosos.

A toda família Rodrigues e Nascimento, em especial minhas avós Auta Rodrigues Vieira e Maria Lima do Nascimento (*in memoriam*) que foram minhas maiores incentivadoras. A todos os tios, tias, primos que fizeram meus dias mais divertidos neste período de dois anos.

Agradeço a todos da Comunidade Bom Samaritano, por me fazerem descobrir um carisma de Acolhimento e Misericórdia dentro de mim, me levando para mais perto de Deus em qualquer lugar que eu vá, me dando a oportunidade de exercer-lo muitas vezes, enquanto estive na UFAL.

E meu agradecimento especial a meu orientador Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara, por caminhar comigo nesses anos de UFAL, por ser muito mais que um orientador, mas um amigo, que acredita que sempre posso ser melhor. Agradeço por toda confiança, consideração, respeito, afeto e paciência, pois a recíproca é verdadeira.

Minha eterna gratidão a todos os que fazem parte da UFAL, todos os professores, em especial :Julicelly, Karla, Gildeni, Annelise, Anaemilia e Wagnner, aos técnicos em especial Luedja, Karina e Grazi, funcionários da limpeza, alimentação e administração, que sempre me trataram com muita educação e respeito, vocês fizeram meus dias mais leves.

Agradeço a todos os colegas de turma do Mestrado, pude conhecer cada um e amadurecer um pouco mais com a vida de vocês. Em especial, Bruno, Luiza e Camila, vocês estarão sempre em minhas orações de gratidão a Deus.

Agradeço a todos da Reprodução Animal, em especial Juliana e Allan Rodolfo, por estarem sempre comigo, acreditando em mim e me auxiliando.

Agradeço a todos os meus ex-alunos, e amigos que tenho na UFAL, sem vocês meus dias não seriam iguais pois me fazem ter esperança em um mundo de pessoas melhores, me ensinaram mais do que imaginam.

Agradeço de forma especial a Fazenda Malícia, na pessoa de Pedro da Rocha Acioli Filho, por todo o apoio e confiança em me proporcionar tão grande, bela e indescritível oportunidade de crescimento profissional. Quem ajuda um pássaro a voar, provavelmente alça vôos muito maiores.

Meus sinceros agradecimentos a Dr. Gustavo Ferrer Carneiro e Dra. Valesca Barreto Luz, por aceitarem estar comigo nesta etapa final.

Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota.

Santa Teresa de Calcutá

RESUMO

Atualmente, um dos desafios na reprodução equina é a baixa taxa de sobrevivência de embriões criopreservados com diâmetro $> 300\ \mu\text{m}$, usando métodos de vitrificação ou clássicos. Pesquisas sobre a influência da bomba de sódio e potássio (Na^+ , K^+ -ATPase) no desenvolvimento embrionário de equinos têm mais de 30 anos e hoje se sabe que participa da cavitação embrionária, modifica o gradiente iônico das células trofoblásticas, além de influenciar a formação, distribuição e permeabilidade das *tight junctions* (TJ) entre células trofoblásticas. Devido aos diversos tipos de isoformas da Na^+ , K^+ -ATPase, a depender das subunidades que a compõe, e a peculiaridades do desenvolvimento embrionário nas diferentes espécies, esse trabalho é caracterizado por uma revisão de literatura, para demonstrar os resultados dos principais estudos na área. Apresenta os resultados de um estudo que foi desenvolvido com o objetivo de buscar um meio capaz de reduzir o diâmetro do embrião equino a campo, para apoiar a vitrificação do blastocisto. Embriões equinos foram recuperados e submetidos a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase por 1 ou 6 h, utilizando ouabaína isolada ou conjugada à sonda fluorescente (OuabaínaFL), durante incubação a 37°C . Os embriões foram avaliados quanto a características morfológicas (microscopia em campo claro) e de viabilidade (Hoechst 33342 + iodeto de propídeo). Acredita-se que este tenha sido o primeiro estudo que objetivou avaliar primariamente os efeitos da inibição da Na^+ , K^+ -ATPase com ouabaína, um inibidor específico, sobre embriões equinos. Observou-se que a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase com ouabaína é capaz de reduzir o diâmetro dos blastocistos equinos, independentemente do dia de desenvolvimento (D7 ou D9), tendo sua confirmada a capacidade de ligação aos embriões a partir de estudos com ouabaína conjugada a sonda fluorescente. Todavia, a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase compromete a viabilidade do embrião, não sendo recomendada a sua adoção com estratégia para redução do diâmetro de blastocistos equinos.

Palavras-chave: Biotecnologia.Vitrificação.Embriologia.

ABSTRACT

Currently, one of the challenges on equine reproduction is the low survival rate of horse embryos cryopreserved with diameter > 300 μm , using either vitrification or classic methods. Researches about the influence of sodium pump and potassium (Na^+ , K^+ -ATPase) on horse embryo development have more than 30 years and nowadays it is known that participates on embryo cavitation, changes ionic gradient of trophoblastic cells, as well as influences formation, distribution and permeability of tight junctions (TJ) between trophoblastic cells. Due to many Na^+ , K^+ -ATPase isoforms, depending on comprising subunits, as well as peculiarities on embryo development depends on species, this work is characterized by a literature review to demonstrate the main results in the field of research. It is also presented the results of a study that aimed to develop a medium able to reduce horse embryo diameter in the field, to support horse blastocyst vitrification. Horse embryos were harvested and subjected to Na^+ , K^+ -ATPase inhibition for 1 or 6 h, using ouabain isolated or conjugates to fluorescent probe (OuabáínaFL), during incubation at 37 ° C. Embryos were assessed for morphometric characteristics (bright field microscopy) and viability (Hoechst 33342 + propidium iodide). To our knowledge, this is the first study that primarily aimed to evaluate the influence of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition with ouabain, a specific inhibitor, on the horse embryos. It was observed that Na^+ , K^+ -ATPase inhibition with ouabain is able to reduce horse blastocyst diameter, in spite of embryo development (D7 ou D9), and ouabain binding to blastocysts were confirmed after embryo exposition to fluorescent conjugated ouabain. However, Na^+ , K^+ -ATPase inhibition compromised embryo viability and it is not recommended as a strategy to reduce horse blastocyst diameter.

Keywords: Biotechnology.Vitrification.Embryology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Processos Iniciais do Desenvolvimento do Embrião equino.....	11
2.1.2	Maturação de oócitos.....	11
2.1.3	A Cápsula e o Embrião equino.....	12
2.2	Situação das tecnologias reprodutivas em equinos.....	13
2.2.1	Transferência de embriões.....	15
2.3	Criopreservação de embriões equinos.....	18
2.3.1	Congelação lenta – método convencional.....	18
2.3.2	Congelação rápida – vitrificação.....	21
2.4	Na⁺, K⁺-ATPase e o embrião.....	23
2.4.1	Adesão célula-célula e a Na⁺, K⁺-ATPase.....	25
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
4	ARTIGO SUBMETIDO.....	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
	ANEXOS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Para que aconteça o reconhecimento materno da gestação em éguas, é necessário que o conceito sinalize sua presença e influencie o sistema endócrino materno, culminando com a implantação embrionária no ambiente uterino (Short, 2008; Bazer, 2015). Além disso, descobrir os mecanismos que indicam como as células embrionárias se unem e se diferenciam é fundamental para a compreensão normal do desenvolvimento de tecidos e informações sobre os mecanismos que governam o desenvolvimento embrionário inicial (Rajasekaran et al., 2003a; Johnson e McConnell, 2004).

Na espécie equina a técnica de criopreservação de embriões é um desafio devido características como: desenvolvimento da cápsula, atividade mitótica e seu grande tamanho (Legrand et al., 2001; Stout, 2012). Estudos iniciais em criopreservação de embriões equinos utilizaram mórulas ou blastocistos $\leq 300 \mu\text{m}$ de diâmetro, sugerindo que pequenos embriões são mais permeáveis aos crioprotetores do que os embriões maiores (Pfaff et al., 1993). Observou-se também que os embriões $> 500 \mu\text{m}$ não re-expandem em comparação com embriões menores, mostrando que crioprotetores não permeiam facilmente o blastocisto (Pfaff et al., 1993).

As pesquisas relacionadas a participação da bomba de sódio e potássio (Na^+ , K^+ -ATPase) no desenvolvimento do embrião equino foram descritas há mais de 30 anos (DiZio e Tasca, 1977). Durante a formação da blastocela, o desenvolvimento pré-implantacional do embrião acontece sob influência da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em diversos eventos, como o processo de cavitação e alterações nos gradientes iônicos por meio do trofotoderma, participação na formação, distribuição e permeabilidade das junções oclusivas (JO) entre células trofoblásticas e expansão do saco vitelino (Manejwala et al., 1989; Violette et al., 2006; Moriwaki et al., 2007; Budik et al., 2008; Farin et al., 2010; Giannatselis et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que o correto funcionamento das JO no trofotoderma é dependente da fosforilação do complexo caderina/catenina e também da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (Rajasekaran et al., 1996; 2001a; Rajasekaran e Rajasekaran, 2003a, 2003b).

Uma vez que a formação da blastocèle é regulada pelas ações de transportadores de íons, canais de água e junções intercelulares, acredita-se que a Na^+ , K^+ -ATPase desempenha papel preponderante, facilitando o movimento da água através do epitélio, em conjunto com os canais de aquaporinas para formar o fluido blastocélico (Budik, 2008). O blastocisto se expande pelo movimento contínuo deste fluido através do epitélio, mas isso não ocorre até que as JO estejam totalmente desenvolvidas e funcionais entre as células do trofotoderma (Watson, 2001).

Estudos com embriões de coelhos, vacas e camundongos (Gardner et al., 1990; Watson et al, 1990; Betts, et al., 1997), avaliaram o efeito do bloqueio da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase com a ouabaína, no entanto em ratos resultou na redução do tamanho embrionário e, após ser colocado em meio livre de ouabaina, continuar de maneira competente seu desenvolvimento (Violette et al. 2006). Diante do exposto, procurou-se a avaliar o efeito do bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase em embriões equinos e seu envolvimento em características morfológicas e de viabilidade em diferentes dias de desenvolvimento (D7 e D9).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processos Iniciais do Desenvolvimento do Embrião equino

Nas éguas, a fertilização acontece na ampola da tuba uterina (Betteridge, 2011), cerca de 12 horas após a ovulação, tendo sido observada a formação de pró-núcleos masculinos e femininos, etapa relacionada e embriogênese inicial, dentro de 34 horas após a ovulação (Bézar et al., 1989; Grondahl et al., 1993). A condução do embrião ao longo do oviduto é auxiliada por diversos mecanismos, como ação ciliar, contrações musculares e deslocamento de fluidos (Goudet, 2011). Porém, é uma característica importante o transporte seletivo de embriões para o útero, uma vez que a ampola é capaz de reter os oócitos (Freeman et al., 1991), incapazes de produzir prostaglandina E2 e estimular a abertura da junção útero-tubárica, com consequente acesso ao ambiente uterino, aproximadamente cinco dias após ovulação (Weber et al., 1991a; Weber et al., 1991b).

Algumas pesquisas apontam que o embrião equino permanece por um período maior no oviduto, resultando em um estágio embrionário mais avançado ao entrar no útero (mórula ou mesmo blastocisto inicial), quando comparado a outras espécies domésticas (Freeman et al., 1991; Freeman et al., 1992).

2.1.2 Maturação de oócitos

No processo de maturação oocitária ocorrem diversas modificações estruturais para que fertilização ocorra de forma competente, dando sequência as fases iniciais da ativação do genoma embrionário (Wassarman e Albertini, 1994).

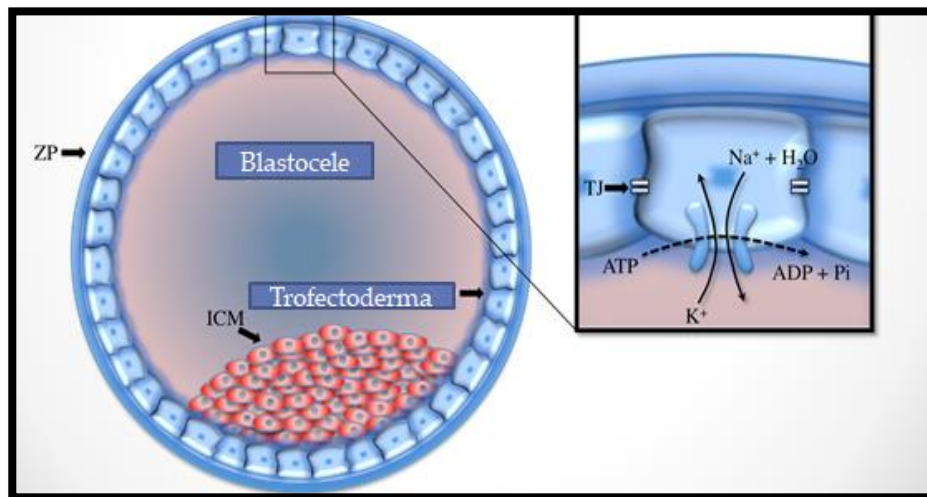
Durante este processo são redistribuídas várias organelas, preparando a célula para a exocitose dos grânulos corticais (Dulcibella et al., 1990). Para que ocorra a fertilização e desenvolvimento embrionário, é indispensável que se tenha um oócito competente e maduro e algumas evidências sugerem que a maturação final dos oócitos equinos ocorre no oviduto (Goudet de 2011). Oócitos maduros continuam sua divisão até chegar na metáfase II, com a extrusão do I corpúsculo polar importante para o crescimento do folículo dominante no período anterior a ovulação (Grondahl et al., 1995; Goudet, 2011).

A Maturação *in vitro* (MIV) tem sido realizada em humanos e várias espécies animais, obtendo bons resultados também na espécie equina. Todavia, alguns relatos demonstraram que oócitos equinos imaturos que conseguem completar a meiose *in vitro* mas apresentam limitações nos processos de fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente (Squires, 1996; Goudet et al., 2000).

2.1.3 A Cápsula e o Embrião equino

Uma particularidade do embrião equino é possuir uma cápsula acelular glicoproteica, entre a zona pelúcida e o trofotoderma (Figura 1) (Betteridge et al., 1982), estando presente como uma camada uniforme sob a superfície interior da zona pelúcida a partir do sexto dia de vida embrionária (Stout et al., 2005). Em embriões de 8 dias a cápsula possui espessura de $1\mu\text{m}$, atingindo cerca de $3\mu\text{m}$ em embriões com 11 dias, tornando-se gradativamente mais fina, até desaparecer completamente em embriões com aproximadamente 23 dias (Flood et al., 1982; Oriol et al., 1993).

Figura 1: Representação esquemática de um blastocisto. ZP, zona pelúcida; ICM, massa celular interna; e TJ, junções oclusivas



Fonte: (Câmara et al., 2016).

A funcionalidade da cápsula ainda não está totalmente elucidada, porém existe a hipótese de que são múltiplos os papéis. As glicoproteínas presentes na cápsula se aproximam das características da família das mucinas, que funcionam como protetoras na superfície de tecidos e auxiliam na interação célula-célula (Oriol et al., 1993). Através destas informações, sugere-se que a cápsula tem como papel

fundamental manter o embrião de forma esférica e impedindo o alongamento do trofoblasto entre os 10 e 16 dias (Allen, 2001). O formato esférico do embrião tem grande importância durante a fase móvel do mesmo no útero e reconhecimento materno da gestação, entre os dias 7 e 17, uma vez que esse padrão inibe a liberação de PGF2 α pelo endométrio (Stout et al., 2005), sendo que a inibição da mobilidade embrionária no útero resultou em luteólise e retorno ao estro (Allen, 2001). A partir do momento em que o embrião é submetido às contrações do miométrio, a cápsula atua também como uma proteção física (Leith e Ginther, 1985; Allen, 2001).

Sugere-se também que a cápsula embrionária possui ação antiaderente, por ser glicoproteica e possuir cadeias laterais de açúcares, incluindo uma maior quantidade de resíduos de ácido siálico, impedindo assim a adesão ao endométrio (Oriol et al., 1993). A cápsula também possui lipocalina endometrial e P19 demonstrando uma contribuição materna para a sua formação (Albihn et al., 2003; Tremoleda et al., 2003), além de proteínas envolvidas no transporte de materiais entre o embrião em desenvolvimento e o ambiente uterino (Betteridge e Waelchli de 2004).

2.2 Situação das tecnologias reprodutivas em equinos

Nos últimos anos, ocorreram avanços nas técnicas de reprodução assistida nos equinos (Squires, 2009) e, nos últimos 15 anos, a pesquisa se direcionou aos processos reprodutivos em nível celular e molecular (Tremoleda et al., 2003; Hinrichs et al., 2005; Galli et al., 2007; Merkl et al., 2010). Diversas técnicas foram desenvolvidas para tentar aumentar os níveis de fertilidade da égua e no garanhão, especialmente devido aos baixos índices de sucesso após a criopreservação, protocolos de resfriamento de sêmen e embriões foram estabelecidos para permitir o transporte à distância, variando em complexidade e custo e sendo aplicadas de acordo com as situações específicas dos animais e seu grau de fertilidade (Carney et al., 1991; Aurich, 2008; Vidament et al., 2012).

Estudos iniciais com criopreservação de embriões equinos utilizaram mórulas ou blastocistos com $\leq 300 \mu\text{m}$ de diâmetro, sugerindo que pequenos embriões são mais permeáveis aos crioprotetores do que os embriões maiores. Isto justifica o fato

de que a espessura da zona pelúcida diminui durante as primeiras 24 horas da formação embrionária, à medida que a espessura da cápsula aumenta (Pfaff et al., 1993). Outros estudos foram realizados em embriões > 500µm de diâmetro utilizando protocolos com diferentes crioprotetores, resultando em menores taxas de prenhez (Saragusty e Arav, 2011; Mukaida e Oka, 2012).

A inseminação artificial caracteriza-se pela deposição de sêmen fresco, refrigerado ou congelado-descongelado no trato reprodutivo de uma fêmea, objetivando produzir uma prenhez (Gordon, 1997). Esta técnica tem sido utilizada há mais de 80 anos, especialmente na Europa, Estados Unidos e China, resultando em grande número de potros nascidos (Allen, 2005; Aurich, 2012).

Gordon (1997) descreveu vários benefícios da IA, como a redução da transmissão de doenças, uso mais eficiente de garanhões, diminuição de lesões em éguas e garanhões, avaliação da qualidade espermática antes da inseminação, possibilidade de distribuição de amostras seminais de garanhões superior em maior distâncias e aumento do comércio de genética animal. Além disso, maiores taxas de prenhez foram relatadas após IA em comparação com a monta natural por Pickett e Shiner (1994), sendo esse incremento de 10% nas taxas de prenhez de éguas férteis e de 30% nas éguas subférteis.

Geralmente as amostras de sêmen coletadas são diluídas em meios contendo antibióticos, glicose e leite, com o objetivo de prolongar a vida útil dos espermatozoides (Kenney et al., 1975).

O sêmen da maioria dos garanhões pode ser armazenado a 4-5°C por 24 a 72 horas, resultando ainda em fertilidade aceitável (Allen, 2005). Todavia, deve-se considerar uma mortalidade esperada de 50% das células espermáticas ao longo desse período de armazenamento, sendo importante então acondicionar um número total de 1×10^9 EMP, diluído na proporção de 3:1 (extensor:sêmen) para obter no momento da inseminação o número padrão de 500×10^6 EMP (Douglas-Hamilton et al., 1984; Brinsko, 2006). Samper (2011) relatou que o sêmen resfriado com 1×10^9 de espermatozoides totais, apresentando 30% de EMP e espermatozoides, geralmente resulta em taxas de prenhez de 50% em éguas inseminadas no máximo 24 horas pós-ovulação.

Nos últimos anos, devido ao baixo número de espermatozoides disponíveis de alguns garanhões, começou-se a estudar a IA utilizando baixas doses inseminantes, sendo atualmente empregadas a IA histeroscópica e a guiada por via

transretal (Brinsko et al., 2003). Taxas de prenhez de até 62% foram relatado com uma dose de inseminação de 5×10^6 EMP usando ambas as técnicas, mas para doses inseminantes contendo entre 1 e 3×10^6 EMP, a técnica de eleição é a histeroscopia (Morris, 2004; Lyle e Ferrer, 2005). As técnicas são uma ferramenta importante quando se utiliza espermatozoides sexados ou congelado-descongelado, resultando em maiores taxas de prenhez em comparação com o protocolo de IA padrão (Morris, 2004; Lyle e Ferrer, 2005).

2.2.1 Transferência de embriões

O primeiro experimento de coleta e transferência de embriões (TE) em mamíferos foi realizado em coelhos por Walter Heape, na Inglaterra, quando em 1890 coletou embriões do útero de uma coelha e os transferiu para o útero de uma coelha receptora, que pariu os láparos. O objetivo do experimento foi examinar a influência do ambiente uterino sobre o fenótipo dos embriões. Em 1949 a organização de um grupo de trabalho na Unidade de Reprodução Animal do Instituto de Pesquisa Agrícola em Cambridge, na Inglaterra, objetivou estudar as possibilidades do emprego da TE nos programas de seleção animal, acelerando as pesquisas na área. Em 1951, foi reportado nos EUA, por Willet e colegas, o nascimento do primeiro bezerro produto da transferência de embriões (Willett et al., 1951).

Desde a década de 1980 a TE é realizada comercialmente (McKinnon; Squires, 2007). O Brasil, é considerado o primeiro no ranking de produção de embriões equinos do mundo, possui aproximadamente 40 centros de TE em equinos, principalmente nos estado de Minas Gerais e São Paulo (Alvarenga, 2010).

Além do Brasil, a Argentina e os Estados Unidos são os países que mais utilizam a TE em equinos no mundo. Segundo a última publicação do Comitê Estatístico da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), em 2010 o Brasil foi responsável por 43% das TE em equinos no mundo, a Argentina, por 29% e os EUA, por 18%. Além disso, tem existido uma demanda a respeito do desenvolvimento de técnicas visando a melhoria da performance reprodutiva de éguas e garanhões mais idosos (Squires, 2005) e estimulando o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução paralelas, como a criopreservação de embriões, ICSI e clonagem por transferência nuclear (Vanderwall, 2000; Hartman, 2011).

A transferência de embriões pode ser realizada de forma cirúrgica ou não cirúrgica. A forma cirúrgica envolve a transferência do embrião para um dos cornos uterinos, após sua exteriorização, e o embrião é depositado no corpo do útero (Allen, 2005). A exteriorização do corno uterino pode ser alcançada através de laparotomia de flanco (Squires et al., 1982), permitindo a obtenção de taxas de prenhez que variavam de 65% a 90% (Squires et al., 1999; Carnevale et al., 2000; Allen, 2005). A abordagem não cirúrgica consiste na deposição do embrião no útero, sendo esse acessado através da cervice (Carnevale et al., 2000). A abordagem pela cervice pode ser realizada utilizando três diferentes instrumentos, dependendo da preferência do técnico: uma pipeta de plástico descartável de transferência de embrião, um instrumento reutilizável de aço inoxidável (inovulador), ou uma pipeta padrão de inseminação artificial (Vanderwall, 2000).

Estudos iniciais relataram menores taxas de prenhez (23% a 45%) obtidas quando os protocolos de transferência de embriões não cirúrgicos foram utilizados em comparação com o cirúrgico (68% a 72%) (Iuliano et al., 1985; Carnevale et al., 2000). Recentemente, demonstrou-se que a transferência não-cirúrgica de embriões resulta em valores semelhantes ou superiores de taxas de prenhez (70% a 85%) quando comparados a transferência cirúrgica (Hinrichs e Choi, 2005; Hartman, 2011; Hinrichs, 2012). Da mesma forma, taxas de prenhez de 90% foram reportada usando uma modificação na abordagem não-cirúrgica com vaginoscópio de Polansky e fórceps Velsellum (Allen, 2005).

A técnica não cirúrgica é tipicamente o método preferido devido ao tempo do procedimento, sendo mais eficiente em termos de custos e mais favorável ao bem estar animal (Stout, 2006). Vale ressaltar que as taxas de prenhez utilizando a transferência não-cirúrgica dependente do técnico e de sua experiência (Squires et al., 1982; Hinrichs, 2012). Além disso, atualmente sabe-se que a deposição do embrião no corno uterino não é obrigatória, pois o embrião equino apresenta mobilidade em todo o útero (Hinrichs e Choi, 2005; Stout, 2006).

A seleção e manejo das éguas receptoras é o fator mais crucial para estabelecer o sucesso da transferência de embriões, devendo essas éguas serem selecionadas com base em características específicas (Vanderwall, 2000; Squires et al., 2003; Jacob et al., 2012). Os estudos retrospectivos determinaram que as características mais importantes para obtenção de prenhez são tônus uterino e cervical, a falta de edema uterino ou dobras uterinas (Carnevale et al., 2000),

histórico de ciclos estrais normais, ausência de anormalidades no trato reprodutivo (Vanderwall, 2000) e idade entre três e doze anos, pois isso reduz a probabilidade de éguas expostas a endometrite crônica (Hartman, 2011).

A sincronia entre a égua doadora e o receptora é um outro fator que deve ser abordado. A sincronia mais favorável ocorre quando éguas receptoras tem ovulado 1 dia antes (1) a 3 dias depois (-3) que a égua doadora, resultando em maiores taxas de prenhez (Squires et al., 2003; Hinrichs e Choi, 2005; Stout, 2006). No entanto, houve relatos de taxas de prenhez similares após a TE entre os dias 1 até - 5 em programas comerciais (Jacob et al., 2012). Estratégias para induzir a ovulação sincrônica entre doadora e receptora envolvem a utilização de PGF2 α , gonadotrofina coriônica humana (hCG) e análogos do GnRH (Squires et al., 1999; Vanderwall, 2000). Outra alternativa para sincronização entre doadoras e receptoras inclui a utilização de éguas receptoras não-cíclicas ou éguas ovariectomizadas, submetidas a tratamento com progestágenos (Hinrichs e Choi, 2005).

Em relação as taxas de recuperação embrionária, tem sido relatados maiores índices nos dias sete (D7) e oito (D8) pós-ovulação que no dia seis (Jacob et al., 2012), fazendo com que embriões nesse estágio de desenvolvimento sejam mais amplamente utilizados comercialmente (Squires et al., 1999; Hinrichs, 2012; Jacob et al., 2012). Ainda, embriões equinos D8 são mais facilmente identificados após a recuperação do lavado uterino (Hinrichs e Choi, 2005), enquanto os embriões D9 e D10 são mais propensos a danos físicos durante o processo de recuperação e transferência (Hinrichs, 2012). Os embriões que morfologicamente apresentam desenvolvimento incompatível com o dia da recuperação, chamados embriões “retardados”, foram associados com a diminuição da taxa de prenhez (Carnevale et al., 2000) .

A qualidade do embrião é outro fator crucial que afeta o sucesso da transferência de embriões, sendo relatado que embriões morfologicamente classificados como grau 1 resultam em taxas de prenhez mais elevadas quando comparado com os de graus 2 ou 3 (Carnevale et al., 2000; Squires et al., 2003).

Tabela 01. Classificação qualitativa de embriões equinos de acordo com características morfológicas.

GRAU	COMENTÁRIO	DESCRIÇÃO
1	Excelente	Nenhuma anormalidade observada; forma esférica; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento apropriado para a idade pós-ovulação
2	Boa	Imperfeições menores, tais como alguns blastômeros extruídos; ligeiras irregularidades na forma, tamanho, cor ou textura; limitada separação entre o trofoblasto e zona pelúcida ou cápsula
3	Pobre	Nível moderado de imperfeições, tais como uma maior percentagem de blastômeros extruídos ou degenerados; colapso parcial de blastocele; ou encolhimento moderado de trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula
4	Degenerado ou morto	Problemas graves facilmente identificados, como uma elevada percentagem blastômeros extruídos, colapso completo do blastocele, ruptura da zona pelúcida, ou degeneração completa e morte embrionária
UFO	UFO	Oócito não fertilizado

McCue et al. (2009)

Carnevale et al. (1987) foram os primeiros a relatar que embriões de equinos armazenados durante 24 horas a 5 °C obtinham uma taxa de prenhez de 70% tendo impacto considerável para a indústria de transferência de embriões, permitindo que criadores, profissionais e veterinários coletem embriões em diferentes locais e envie-os para centros onde eles poderiam ser transferidos para receptoras (Squires et al., 2003). Carney et al. (1991) relataram taxas de prenhez semelhantes quando os embriões equinos foram transferidos após armazenamento durante 24 horas a 5°C, em comparação com os embriões transferidos no máximo uma hora após a coleta.

2.3 Criopreservação de embriões equinos

2.3.1 Congelação lenta – método convencional

A congelação de embriões visa preservar o metabolismo celular em quiescência através do armazenamento em baixas temperaturas, que induz à parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, conservando-o potencialmente viável por tempo indeterminado (Gordon, 1994), sendo a eficácia dessa técnica fundamental para ampliação da comercialização dos

embriões (Stookey, 1998). Grande parte dos embriões mamíferos são congelados através de métodos convencionais, com baixa concentração de crioprotetores de lenta penetrabilidade e refrigerado através de equipamentos de congelação programáveis (Vajta e Nagy, 2006).

Durante o processo de criopreservação, as células vivas estão expostas a lesões por diversos motivos como: toxicidade dos agentes crioprotetores, lesões físicas por gelo extracelular, formação e crescimento de gelo intracelular, além do estresse osmótico (Kasai, 1996). Se por ventura houver formação de cristais de gelo as membranas se rompem, dando origem a um processo de desnaturação das organelas intracelulares e desestabilização do citoesqueleto, impedindo a comunicação das células embrionárias (Dobrinsky, 1996).

A criopreservação em equinos foi relatada pela primeira vez por Griffin et al. (1981), quando 19 embriões foram congelados, quatro foram transferidos para receptoras após a descongelação e apenas uma prenhez inicial foi confirmada, com absorção aos 60 dias de gestação. No ano seguinte, Yamamoto et al. (1982) relataram o nascimento de um potro vivo resultante da transferência de embriões equinos criopreservados. Slade et al. (1985) confirmaram que em um protocolo de arrefecimento lento, a temperatura de mergulho em nitrogênio líquido (NL₂) afeta a qualidade embrionária após a descongelação, mas ainda relataram 53% taxa de prenhez quando os embriões congelados em palhetas foram imersos em NL a -33 ° C.

Durante o processo de congelação, utiliza-se crioprotetores que aumentam a viscosidade da solução, conferindo um maior equilíbrio osmótico entre solução e material biológico (Lucci e Dalcin, 2010). Segundo Karow (2001) estas substâncias são usadas com o intuito de impedir efeitos nocivos às células relacionadas com a formação de cristais de gelo e ao choque osmótico, podendo ser penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas e capazes de penetrar a membrana celular, formando pontes de hidrogênio com a água intracelular, diminuindo a temperatura de congelação e prevenindo a formação dos cristais de gelo, podendo ser citados o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol e dimetilssulfóxido (Vajta e Nagy, 2006). Os crioprotetores não penetrantes como sacarose, galactose e trealose permanecem no meio extracelular, retirando a água livre e levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico (Vajta e Nagy, 2006; Pereira e Marques, 2008).

Bass et al. (2004) avaliaram a eficácia do metanol para a criopreservação de blastocistos equinos no D7 e D8 (300-1000 μ m de diâmetro), sendo os embriões aleatoriamente criopreservados em metanol a 48% e glicerol a 10% em palhetas de 0,25 ml, cultivados *in vitro* (12h) após a descongelação e, em seguida, transferidos para as receptoras, resultando em taxas de prenhez de 23% (metanol) e 38% (glicerol).

Outras substâncias adicionadas as soluções com crioprotetores também foram testadas, visando melhorar os resultados. A associação de etilenoglicol com sacarose foi avaliada para a criopreservação de embriões equinos de seis dias (D6) (Hochi et al., 1996), com os seguintes tratamentos: 10% de glicerol, 10% etilenoglicol e 10% de etilenoglicol + 0,1 M de sacarose, resultando em 37,5, 25,0 e 63,6% de prenhez, respectivamente. Em um estudo utilizando embriões D6,5, o efeito da adição de 0, 20 e 100 mM de L-glutamina em solução de glicerol a 10% de foi avaliado, resultando em taxas de prenhez de 30%, 10% e 60% respectivamente, segundo os autores resultado da menor proporção de danos celulares, avaliada com 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), para embriões congelados em solução contendo 100 mM de L-glutamina (Lagneaux et al., 2000).

A fase de desenvolvimento embrionário no momento da criopreservação convencional também influencia as taxas de prenhez, sendo de 80% e 14% para blastocisto inicial e blastocisto expandido, respectivamente (Poitras et al., 1994), corroborando com Slade et al. (1985), que afirmaram que mórulas e blastocistos iniciais resultam em melhores taxas de prenhez após a transferência para receptoras.

Uma provável explicação para os melhores resultados obtidos na criopreservação de embriões no estágio de mórulas ou blastocistos iniciais, com diâmetro de até 300 μ m, é que a partir desse estágio observa-se o desenvolvimento da cápsula embrionária, o que interfere com a permeabilidade do embrião aos crioprotetores (Pfaff et al., 1993). Legrand et al. (2001) avaliaram a relação entre a espessura da cápsula e o dano celular em embriões expostos ao glicerol, tendo sido demonstrado que embriões sem cápsula ou com cápsula delgada apresentavam uma redução nos danos celulares, tendo os autores atribuído esse efeito a uma maior eficácia na penetração do glicerol. Em um estudo posterior, Gillard et al. (2011) avaliaram a permeabilidade da cápsula embrionária equina, coletadas de embriões D14 e D18, ao glicerol e etilenoglicol e relataram que a permeabilidade a

1,5 M de etilenoglicol foi significativamente maior do que 0,74 M de etilenoglicol e 0,87 M glicerol, sendo todos esses tratamentos inferiores aos resultados obtidos com solução salina, o que conduziu os autores a concluir que a cápsula embrionária atual também como um filtro seletivo, resultados similares aos descritos por Barfield et al. (2010).

Estratégias que interferem com o citoesqueleto celular, como o uso de citocalasina B, que resultou em melhores resultados de sobrevivência embrionária em embriões suínos pós-descongelação (Dobrinsky et al., 2000), não parece exercer influência sobre a taxa de prenhez de embriões equinos descongelados (Maclellan et al., 2002). Dessa forma, foi proposto que a redução do teor de água em blastocistos expandidos aumentaria a sua eficiência de criopreservação. Nesse sentido, Barfield et al. (2009) avaliaram o efeito da desidratação de embriões equinos grau 1 (diâmetro $\geq 400 \mu\text{m}$) antes da criopreservação, utilizando 0,6 M de galactose, mas não foi observada influência significativa sobre as taxas de prenhez.

2.3.2 Congelação rápida - vitrificação

A vitrificação foi realizada primeiramente em embriões de camundongos por Rall e Fahy (1985). Com o passar dos anos, foram publicados diversos trabalhos com oócitos e embriões de diversas espécies, explorando novas formas de se misturar, combinar, adicionar ou remover os crioprotetores, além de formas diferentes de armazenamento (Vajta e Kuwayama, 2006). Esta técnica elimina a formação de cristais de gelo. Nela, a solidificação é atingida pelo aumento extremo da viscosidade e não pela cristalização, alcançando a fase vítrea (Massip, 2001; Yavin e Arav, 2007; Mukaida e Oka, 2012). A vitrificação pode ainda minimizar o dano de refrigeração por meio de arrefecimento rápido (Kasai, 2002).

Para que se tenha êxito nesta técnica, três fatores são de grande importância: 1) taxa de arrefecimento/aquecimento, 2) tipo e concentração de crioprotetor e 3) o volume do embrião a ser vitrificado (Saragusty e Arav, 2011). Taxas de resfriamento e aquecimento estão relacionadas com o volume e o material em que o embrião é vitrificado. Saragusty e Arav (2011) relataram várias técnicas que podem ser utilizadas para reduzir volume total da amostra (célula ou tecido alvo + meio de vitrificação), como auxílio de microscopia eletrônica, Cryotop, Cryoloop e Cryoleaf, que são procedimentos utilizando equipamentos de manipulação e envase

específicos. Outro ponto crítico a ser considerado é o adequado reaquecimento após a vitrificação, sendo muitas vezes considerado um ponto mais importante para a sobrevivência embrionária que a taxa de arrefecimento (Leibo, 2011). Além disso, durante o reaquecimento, deve-se utilizar soluções hipertônicas, geralmente contendo sacarose, para impedir a rápida entrada de água no embrião (Leibo, 1983; Kasai, 2002). Outros açúcares como galactose, frutose e glicose tem função semelhante e não são potencialmente tóxicos para as células criopreservadas (Kasai, 1996).

O primeiro produto viável proveniente do uso de embriões equinos vitrificados foi obtido por Yamamoto et al. (1982), quando relataram 9% de prenhez. Em outras pesquisas, embriões com diâmetros iguais ou inferiores a 300 μm resultam em taxas de prenhez satisfatórias, variando entre 64% e 80% após o cultivo (Hochi et al., 1996), enquanto embriões com diâmetro superior a 300 μm resultam em taxas de gestação baixa (MacLellan et al., 2002).

Mais recentemente, o primeiro estudo que resultou em prenhez após a transferência direta de embriões de equinos vitrificados foi realizado por Eldridge-Panuska et al. (2005). Neste estudo, os embriões equinos coletados nos dias 6, 7 e 8 pós-ovulação foram expostos a 1,4 M de glicerol em PBS durante 5 minutos, seguido de 1,4 M de glicerol + 3,6 M de etilenoglicol, durante 5 minutos e posteriormente transferidos para 3,4 M de glicerol + 4,6 M de etilenoglicol ou o mesmo procedimento modificando o final da solução de vitrificação para 1,4 M de glicerol + 6,6 M de etilenoglicol. As prenhez foram apenas obtidas com embriões $\leq 300 \mu\text{m}$, utilizando uma concentração final de 3,4 M de glicerol + 4,6 M de etilenoglicol. Araújo et al. (2010) relataram taxas de prenhez após a vitrificação de embriões D6 em 67% e 55% nos anos de 2008 e 2009, com uma taxa de perda embrionária até 45 dias de gestação em 12,5% e 9,1% para os mesmos anos respectivamente.

Todavia, a criopreservação de embriões equinos com diâmetro maior que 300 μm tem sido um desafio, e novos métodos foram avaliadas para aumentar a sua eficiência. Scherzer et al. (2011) avaliaram método de vitrificação assistida por laser para a criopreservação de embriões equinos de grande diâmetro, utilizando embriões com diâmetro inferior a 300 μm como controle. Os embriões do grupo tratado receberam um pulso de laser, sendo em seguida vitrificados (controle e tratado) em solução de 7,5% de etilenoglicol + 7,5% de DMSO durante 20 minutos,

em seguida 15% de etilenoglicol + 15% de DMSO, obtendo-se taxas de prenhez no dia 13 de 75% para os embriões $\leq 300 \mu\text{m}$ e 44% para os embriões $> 300 \mu\text{m}$. No entanto, apenas uma prenhez do embriões $> 300 \mu\text{m}$ foi detectado no dia 23 e levada a termo.

Em estudo no qual o objetivo primário era desenvolver um método para biópsia embrionária, foi observado que, mesmo colapsados, os embriões preservaram alta viabilidade (Choi et al., 2010). Seguindo essa linha de pesquisa, os autores avaliaram o efeito do colapso em blastocistos iniciais e expandidos (D7 e D8), com tamanho variando entre 330 e 730 μm , vitrificados com etilenoglicol ou DMSO e incubados após o reaquecimento por 4 a 6 horas antes da TE, resultando em taxas de 50% de prenhez ao dia 12 com DMSO e 46% com etilenoglicol.

O tratamento com etilenoglicol demonstrou maior segurança pois todas as prenhez foram confirmadas no dia 25, enquanto apenas duas prenhez se mantiveram até esse período quando utilizou-se o DMSO como crioprotetor (Choi et al., 2011b).

2.4. Na^+ , K^+ -ATPase e o embrião

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma proteína transmembrana, membro das ATPases de tipo P (Apell 2004; Shinoda et al., 2009) e sua identificação e função como bomba de íons foi reconhecida há mais de 100 anos (Glynn 2002). Esta enzima serve como um receptor para glicosídeos cardíacos, tais como ouabaína e digoxina (Lingrel e Kuntzweiler 1994; Peng et al., 1996; Sandtner et al., 2011). Através da hidrólise de uma molécula de ATP a enzima realiza o cotransporte de três íons Na^+ e dois íons K^+ , como consequência de fosforilação e desfosforilação da Na^+/K^+ -ATPase, respectivamente, proporcionando assim uma via transmembranar polar ativa contra um gradiente de concentração (Blanco e Mercer 1998; Kaplan 2002; Reyes e Gadsby 2006). Tem como papel principal manter os gradientes de Na^+ e K^+ através das membranas celulares (Jorgensen et al., 2003) e participar ativamente do processo de termogênese (Kelly e McBride, 1990).

Como um heterodímero, a Na^+ , K^+ -ATPase é formada por duas subunidades principais (α e β). Além disso, uma das quatro subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) pode ser associada a uma das três subunidades β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$), resultando na expressão de uma ou mais isoformas dentro de uma célula ou tecido (por exemplo, ambos

$\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$ estão presentes nos espermatozoides), o que poderia resultar em papéis biológicos distintos (Blanco et al., 1995; Jorgensen et al., 2003; Watson et al., 2007). Embora as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ sejam consideradas onipresentes (Hickey e Buhr 2012), a subunidade $\alpha 4$ aparentemente só foi detectado em testículos e espermatozoides (Woo et al., 1999, 2000; McDermott et al., 2015). Adicionalmente o seu papel como bomba de íons, Na^+ , K^+ -ATPase é capaz de interagir com outras proteínas de membranas ou citosólicas (Lucas et al., 2012), com papéis no metabolismo espermático (Woo et al., 2000) e desenvolvimento embrionário (Violette et al., 2006).

Descobrir os mecanismos que indicam como as células embrionárias se unem e se diferenciam é fundamental para a compreensão normal do desenvolvimento de tecidos e informações sobre os mecanismos que governam o desenvolvimento inicial (Rajasekaran et al., 2003a; Johnson e McConnell, 2004). Após o processo de clivagem, o embrião é responsável pelo processo de transcrição que rege seu desenvolvimento (Schultz, 1993; De Souza et al., 1998). A Na^+ , K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral do trofotoderma, participa da movimentação de Na^+ e água para a blastocela (Wiley 1984; Watson 1992b; Marikawa e Alarcon, 2012), sendo observado um aumento de sua atividade e expressão/localização durante o desenvolvimento do blastocisto (Betts et al., 1998, Rodriguez et al., 2006), tornando-se responsável pelo consumo de 10-40% da energia utilizada pelo blastocisto durante a fase de expansão (Donnay e Leese 1999, Houghton et al., 2003).

A distribuição de Na^+ , K^+ -ATPase é controlada pelo equilíbrio e estabilidade do citoesqueleto de membrana (Fleming, 1987) e a adesão celular mediada por E-caderina (Watson et al., 1990; Kemler, 1993). A inibição da Na^+ , K^+ -ATPase em culturas celulares utilizando um glicosídeo cardíaco chamado ouabaína ou cultura em meio ausente de K^+ impede a formação de junções oclusivas (JO), estimula a separação entre as células e seu substrato além de interromper a polaridade celular (Contreras et al., 1999; Fleming et al., 2001; Rajasekaran et al., 2003a, b).

O embrião pré-implantação de rato é um modelo interessante para entender como ocorre a regulação da diferenciação de células epiteliais (Wiley et al., 1990; Fleming et al., 2001; Watson e Barcroft, 2001; Johnson e McConnell, 2004; Watson et al., 2007). A primeira célula diferenciada no desenvolvimento de blastocistos de mamíferos é o trofotoderma epitelial (TE), formando uma cavidade com líquido e a

massa celular interna (ICM), que são as progenitoras de todas as linhagens celulares embrionárias (Watson e Barcroft, 2001; Johnson e McConnell, 2004).

No processo de compactação, as células iniciais se unem através de junções oclusivas (JO), junções aderentes (JA), desmossomos e junções gap (JG) (Watson et al., 1990a, b; Kidder, 1992; Fleming et al., 2000a, b). Os contatos próximos célula-célula são mediados por Ca^{2+} e molécula E-caderina, se tornando ausente somente nas áreas apicais das células (Johnson et al., 1986; Torres et al., 1997).

As JO focais dividem a membrana plasmática dos blastômeros externos em áreas apicais, separadas em domínios da membrana basolateral (Fleming et al., 2000a, b). Além disso, a polaridade celular no embrião pré-implantação é caracterizada pelo estabelecimento de microvilosidades apicais (Edmonds et al., 1982), associação de receptores de lectina, agregação apical de feixes de actina e vesículas endocíticas, além da migração de vesículas lipídicas e mitocôndrias (Edwards, 1997; Johnson e Maro 1986 apud Watson e Barcroft, 2001). As superfícies basolaterais dos blastômeros externos permanecem livres de microvilos, mas se distinguem das superfícies apicais pela localização do polipeptídeo ZO-1 de junção oclusiva (Fleming et al., 1984 apud Watson 2001) junções de espaço e E-caderina (uvomorulina). Após o estágio de blastocisto, o embrião rompe a zona pelúcida e inicia o contato entre o trofoblasto e o endométrio, para iniciar a fase de implantação (Watson e Barcroft, 2001).

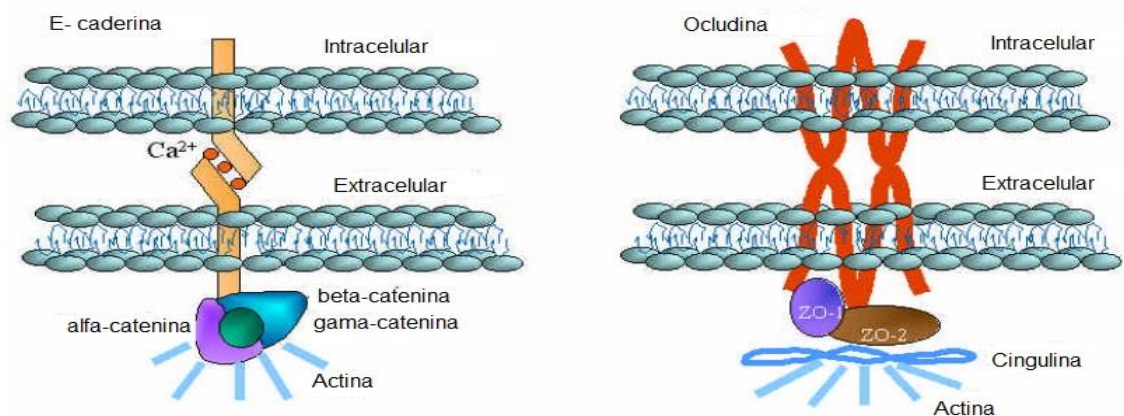
2.4.1 Adesão célula-célula e a Na^+ , K^+ -ATPase

Para que aconteça um bom desenvolvimento embrionário a adesão celular é crucial, e vários estudos comprovaram que a ausência desta adesão celular interrompe os eventos de segmentação no conceito, pois regula a morfogênese epitelial e, durante a fase de blastocisto, o primeiro epitélio formado obedece a um transporte vetorial comandado pela Na^+ , K^+ -ATPase (Edwards, 1997; Elster et al., 1998). Atualmente experimentos realizados com embriões de ratos são mais bem explicativos quando se trata de adesão celular, começando pela compactação, onde as células se unem firmemente através de proteínas de adesão, que formam um cinto ao redor das células e localizando-se especificamente na região latero-apical (Biggers et al., 1988). O processo de compactação gera células com contorno

pouco identificável sendo mediado pela ativação da E-caderina (Vestweber et al., 1985).

A E-caderina, componente fundamental das JO, é uma das proteínas transmembrana que se liga extracelularmente às junções aderentes e com as cateninas na margem citoplasmática, formando o citoesqueleto de actina (Ducibella e Anderson, 1975). Para manter o contato de forma estável entre células e placas de adesão, ocorrem ligações entre o citoesqueleto de actina e alfa-catenina, beta-catenina e gama-catenina (Gumbiner e McCreas, 1993; Hoschuetzky e Kemler, 1994; Huber e Kemler, 1996) – Figura 2.

Figura 2: Organização molecular da zônula aderente (lado esquerdo) e zônula oclusiva (lado direito) em células epiteliais polarizadas



Fonte: (Watson, 2001).

E-caderina e cateninas, bem como a actina citoesquelética, provém da oogênese, portanto, elas estão presentes no embrião inicial de mamíferos a partir da fertilização (McCreas et al., 1991; Torres et al., 1997). No entanto, a adesão célula-célula mediada por E-caderina estável não ocorre até a compactação ser iniciada (Hynes, 1992; Haegel et al., 1995).

A dependência da compactação e da cavitação em eventos mediados por E-caderina foi demonstrada pelo tratamento de embriões murinos com anti-soros bloqueadores de E-caderina (Watson, 1997). Os embriões tratados com um anticorpo contra a E-caderina não sofrem compactação e não seguem uma cavitação normal (Watson, 1997 apud Watson, 2001). Vale ressaltar que embriões

ovinos e humanos são mais sensíveis ao bloqueio da Na⁺, K⁺-ATPase se comparados a outras espécies como ratos (Price et al., 1990; Contreras et al., 1995b). Em experimentos realizados em embriões de ratos *knockout* para a subunidade alfa1 da Na⁺, K⁺-ATPase, observou-se perda embrionária e fetal, enquanto em animais *knockout* para a subunidade alfa2, observou-se mortalidade neonatal, enquanto em camundongos ocorrem falhas na fase de implantação (Lingrel et al., 2003; Barcroft et al., 2004).

Sugeriu-se que a E-caderina contribui para a permanência do complexo juncional epitelial e a inserção de Na⁺, K⁺-ATPase nas membranas basolaterais (Larue et al., 1994). Pesquisadores observaram em amostras de rim canino e retina humana que a inibição da Na⁺, K⁺-ATPase pela oubaína ou cultivo celular em meio pobre em K⁺ resultou na interrupção da formação das JO e não polarização celular (Contreras et al., 1999; Rajasekaran et al., 2003a, b). Troxell et al. (2000) relataram o funcionamento das junções aderentes e da Na⁺, K⁺-ATPase sobre o transporte vetorial de íons junto com a organização estrutural, demonstrando ser imprescindível para que ocorra os eventos de polarização celular e junções oclusivas em células de rim canino (MDCK).

No entanto, em embriões de ratos *knockout* para E-caderina, foi observando que houve compactação, porém sem o desenvolvimento de blastocisto normais, confirmando que sua remoção não impede a polarização celular, mas sim a formação ordenada das células do trofotoderma (Riethmacher et al., 1995). Da mesma forma, o epitélio do trofotoderma de *knockout* para alfa-catenina é anormal e interrompe a formação do estágio de blastocisto (97), no entanto *knockout* para beta-catenina e gamma-catenina murinos desenvolvem-se até a gastrulação, sugerindo que as reservas maternas destas proteínas são suficientes (Guenet et al., 1995; Haegel et al., 1995; Bierkamp et al., 1996). A Gamma-catenina, é a única proteína conhecida compartilhada por desmossomos e junções adesivas (JAs) (Fleming et al., 1991). Assim, embora todos os componentes do JA participem da compactação e diferenciação do trofotoderma, suas funções são variáveis.

Pesquisas indicam a existência de um inibidor de interações de E-caderina/catenina, que desestabiliza os complexos juncionais, através das IQGAPs, alvos de Rho GTPases (Kuroda et al., 1999; Reuther e Der, 2000). As IQGAP1 ligam-se ao terminal amino da beta-catenina com E-caderina *in vivo* e *in vitro*,

promovendo a desagregação da alfa-catenina e impedindo a adesão celular mediada por caderina (Kuroda et al., 1996; Kaibuchi et al., 1999).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto é de fundamental importância elucidar a relação existente entre a Na^+ , K^+ -ATPase e a formação do complexo juncional presente nas células trofoblásticas de blastocistos equinos.

4. ARTIGO SUBMETIDO

Na^+ , K^+ -ATPase inhibition is detrimental to horse blastocyst

[A inibição da Na^+ , K^+ -ATPase é prejudicial para o blastocisto equino]

A.D. Nascimento Júnior, J.C.C. Marques, A.R.R. Cezar, D.R. Câmara

Laboratório de Reprodução Animal (LARA), Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, AL,
Brazil

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the effect of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition on horse blastocyst. Sixteen mares were ultrasonographically monitored and inseminated after induced ovulation. Embryos (D7 and D9) were harvested and exposed to Na^+ , K^+ -ATPase inhibition during 1 or 6 h using ouabain both isolated and conjugated to fluorescein (OuabainFL) during incubation at 37° C. The embryos were evaluated regarding morphometric characteristics (bright field microscopy) and viability (Hoescht 33342 + propidium iodide). The blastocysts incubated during 6 h in Holding medium + ouabain (n=3) presented a diameter reduction average of 45.7%, associated to adverse morphologic features and no reexpansion after subsequent 12 h incubation in Holding medium. After 1h embryo explosion to Ouabain or OuabainFL, they presented similar reduction average ($P>0.05$), being $38.7 \pm 6.7\%$ (n=5) and $33.6 \pm 3.3\%$ (n=7) for D7 and D9 blastocysts, respectively. Ouabain binding was confirmed after OuabainFL exposition and all embryos (n=12) lost viability. It was concluded that Na^+ , K^+ -ATPase inhibition with ouabain is not recommended aiming chemical reduction of horse blastocyst size due to embryonic death.

Keywords: embryology, horse embryo, sodium pump

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da inibição da Na^+ , K^+ -ATPase sobre o blastocisto equino. Dezesesseis éguas foram monitoradas por ultrassonografia e inseminadas após indução da ovulação. Embriões (D7 e D9) foram recuperados e submetidos a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase por 1 ou 6 h, utilizando ouabaína isolada ou conjugada à sonda fluorescente (OuabaínaFL), durante incubação a 37° C. Os embriões foram avaliados quanto características morfológicas (microscopia em campo claro) e viabilidade (Hoechst 33342 + iodeto de propídeo). Os blastocistos mantidos em meio Holding com ouabaína por 6 h (n=3) apresentaram redução média em seu diâmetro de 45,7%, com características morfológicas

indesejáveis e nenhuma reexpansão nas 12 h de incubação subsequentes em Holding. Quando os embriões foram expostos a ouabaína ou OuabaínaFL por 1 h, os blastocistos tiveram uma redução média similar ($P>0,05$) após 1h de incubação subsequente em meio Holding, sendo de $38,7 \pm 6.7\%$ ($n=5$) e $33,6 \pm 3,3\%$ ($n=7$), para os blastocistos D7 e D9, respectivamente. Foi confirmada a ligação da ouabaína com utilização OuabaínaFL e todos ($n=12$) os embriões perderam sua viabilidade. Concluiu-se que o bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase com ouabaína não é recomendado visando a redução química do tamanho dos blastocistos equinos, pois resulta em morte embrionária.

Palavras-chave: embriologia, embrião equino, bomba de sódio

INTRODUCTION

In the horse, embryo cryopreservation has been a challenge due to capsule development, mitotic activity and predominantly because of embryo size (Legrand *et al.*, 2001; Stout, 2012). In the past years, vitrification has become the most usual method to cryopreserve embryos, and many manuscripts have been published focused in several species, exploiting new strategies to combine, add and remove cryoprotectants, as well as distinct processing techniques (Vajta and Gjeris, 2006).

The first foal born after horse embryo vitrification was obtained by Yamamoto *et al.* (1982), when 9% of pregnancy rate was reported. Currently, the cryopreservation of horse embryos with less than $\leq 300 \mu m$ of diameter results in satisfactory pregnancy rates, between 64% and 80% (Hochi and Maruyama, 1996). However, lower pregnancy rates were obtained when horse embryos with diameter $> 300 \mu m$ were vitrified (MacLellan *et al.*, 2002). Choi *et al.* (2010) performed a study where their primary goal was to develop an embryonic biopsy method, with the aid of micromanipulator, and notice that embryos remained viable even collapsed. Following, the same authors evaluated the effect of blastocoel cavity collapse in large embryos prior vitrification (between 330 and 730 μm), and pregnancy rate of approximately 50% was achieved (Choi *et al.*, 2011).

Nonetheless, the equipment costs to execute micromanipulation are high, and the establishment of chemically defined medium able to reduce horse blastocyst diameter could support the adoption and dissemination of vitrification technique in large horse embryos in the field. Strategies that interfere with cellular cytoskeleton, such as cytochalasin-B, resulted in higher rates of pig embryo survival post-thawing (Dobrinsky *et al.*, 2000), but no positive influence on thawed horse embryos was reported, when the authors stated that reduction of

water ratio in expanded blastocysts could improve cryopreservation effectiveness (Maclellan *et al.*, 2002).

It is known that pre-implantation embryo development is influenced by Na^+ , K^+ -ATPase activity, promoting embryo cavitation and modifying ionic gradient on trophoctoderm epithelium, interfering with formation, distribution, and permeability of tight junctions (TJ) between trophoblastic cells (Manejwala *et al.*, 1989; Budik *et al.*, 2008; Giannatselis *et al.*, 2011). Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition on morphological characteristics and viability of the horse blastocyst, pursuing embryo size reduction and favoring vitrification in this species.

MATERIAL AND METHODS

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas, under protocol number 35/2017.

Sixteen mares and one Margalarga Marchador stallion, located in Viçosa-AL, Brazil (9°23' S; 36°15' O) were used in this study. The animals were raised in semi-extensive conditions, with free access to good quality water and grass, plus supplementation with 4 kg concentrate/head/day. All the animals were breeding soundness and there was no report of reproductive disorder. Follicular growing and uterine characteristics of the mares were monitored every two days, with aid of transrectal ultrasonography during regular estrous. In estrous mares presenting follicles > 35 mm and uterine edema grade 3 (0-5; Samper, 1997) were administrated deslorelin acetate (1 mg/IV), to stimulate ovulation.

When ovulation was confirmed (D0), the mares were artificially inseminated with 5×10^8 motile sperm, 24 h after deslorelin injection, using routine procedures (Aurich *et al.*, 1997). Following, on D7 or D9, the mare's uterus was flushed three times (Ringer's solution) per attempt of embryo collection, using a closed system. The remaining fluid in the filter was searched in a sterile Petri dish and recovered embryos were washed ten times in Holding solution (EquiHold, Minitube, Tienfenbach, Germany), loaded into 0,5 mL straws and further transported to the laboratory, within 30 min.

Immediately after arrived in the laboratory, the embryos were transferred to a new Petri dish containing Holding (100 µl) covered by sterile mineral oil (200 µl), and kept during 1 h at 37 °C for adjustment to incubation system before further protocols. After that, the embryos were morphologically evaluated (McCue *et al.*, 2009) using an inverted microscope (Medilux MDL-INV-1, Biosystems), and embryos diameter were recorded after digital images were captured with aid of a micrometric ruler (1 mm) and ImageJ software (Version

1.52a, Schneider *et al.*, 2012). Diameter reducing was calculated in percentage, based on embryo diameter after 1 h incubation in Holding medium (37 ° C), considered as 100% of initial diameter, as follow:

$$\text{Final diameter (\%)}: \frac{100 \times \text{final embryo diameter}}{\text{initial embryo diameter}}$$

In total, 17 embryos were recovered, all classified as grade I. Two blastocysts D7 were incubated only in Holding medium for 24 h at 37 ° C to evaluate the influence of culture system on embryo quality. Two D7 and one D9 blastocysts, after initial incubation in Holding medium (1h), were transferred and maintained 6 h in Holding medium + Na⁺, K⁺-ATPase specific inhibitor (ouabain, 10⁻⁶ M; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), under same initial incubation conditions. Following, blastocysts were withdrawn from ouabain-treated medium and incubated for 12 h in Holding, to analyze embryo reexpansion. During this period, the blastocysts were photomicrographed within 1 h interval, and subsequent morphological and morphometric evaluation were performed.

Based on the results of the first experiment, it was decided to evaluate Na⁺, K⁺-ATPase inhibition during a shorter period and assess embryos using fluorescent probes. Propidium iodide (PI, 10 µg/mL, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), Hoechst 33342 (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), fluorescent conjugated ouabain (10⁻⁶ M, BobipyTM FL ouabain; Invitrogen, São Paulo, Brazil) and ouabain (10⁻⁶ M) were used after dilution in Holding medium. Analyses were performed using epifluorescence microscopy (Feldmann Wild Leitz- 3500T FL), with excitation/emission filters of 533/617, 361/497, 503/512 for PI, Hoechst 33342 and BobipyTM FL ouabain (OuabainFL), respectively.

Six blastocysts D9 and one D7 were incubated (1 h, 37 ° C) in Holding + ouabain, followed by Hoescht and PI staining to evaluate the membrane integrity of trophoblastic cells. Moreover, to confirm ouabain-embryo binding, four D7 and one D9 blastocysts were incubated (1 h, 37 ° C) in Holding + OuabainFL + Hoechst, followed by IP staining. Before and after incubation, the blastocysts were photomicrographed also in bright field, to analyze morphology and diameter.

Results of the present study are predominantly presented using descriptive statistics. Diameter reduction of D7 and D9 blastocysts exposed to ouabain or ouabainFL were compared after normality analysis (Shapiro-Wilk test), followed by ANOVA and F test, with data presented as means ± S.E.M. Results were considered significant when P<0.05.

RESULTS

Both D7 blastocysts kept in Holding medium preserved their morphologic features and increased in size during 24 h incubation (Figure 1). The three blastocysts maintained in Holding + ouabain (10^{-6} M) during 6 h reduced their diameter in 35.9%, 48.7% and 52.5% (D7, D7 and D9, respectively), with no subsequent reexpansion for up to 12 h in Holding medium (Figure 2 – A to C).

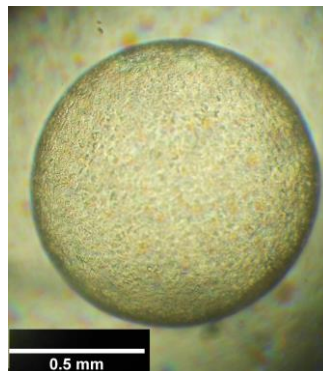


Figure 1. Horse blastocyst harvested at D7, after 24 h in Holding medium at 37 °C, with morphologic characteristics compatible with Grade 1 (1-5).

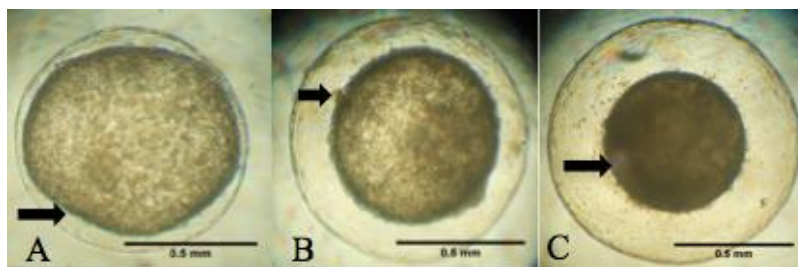


Figure 2. Horse blastocyst harvested at D9, after 1h exposed to Holding + ouabain (10^{-6} M, (A)); after ouabain exposition withdraw and maintained 3 h (B) and 6 h (C) in Holding medium. It is possible to observe morphological alterations in the embryo (arrows), such as capsule detachment (A), granular surface and trophoblastic cells with different sizes (B), culminating with blastocoel collapse (C).

Regarding fluorescent analysis, it was observed that ouabain bound to trophoblastic cells (Figure 3A), confirming the presence of Na^+ , K^+ -ATPase. Moreover, 100,0% (12/12) of the blastocysts exposed to ouabain or ouabainFL were positive for PI staining after incubation time (Figure 3B). It is noteworthy that blastocysts D7 and D9 displayed similar diameter

reduction after 1 h incubation, regardless exposition to ouabain or ouabainFL. Blastocysts D7 (n=5) reduced $38.7 \pm 6.7\%$ and D9 (n=7) reduced $33.6 \pm 3.3\%$ ($P>0.05$). Furthermore, all blastocysts displayed adverse morphologic features, such as heterogeneous texture (100.0%, 12/12), extrusion (100.0%, 12/12), capsule detachment (83.3%, 10/12) and irregular shape (36.4%, 5/12).

Two D7 blastocysts were removed from Holding + ouabain medium after 1 h of incubation and transferred to Holding medium for up to 6 h, but no further reexpansion was observed, confirming the lack of viability.

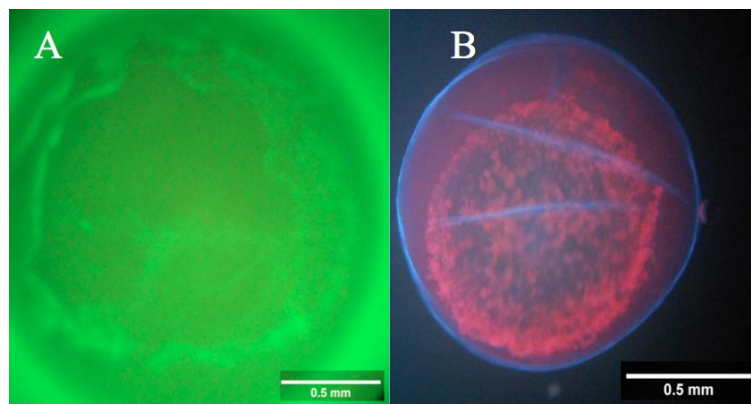


Figure 3. Horse embryo D9 exposed to ouabain conjugated to fluorescent probe (A) indicating ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATPase. Horse embryo D9, after incubation with Holding + ouabain (1h), followed by exposition to Hoechst 33342 and propidium iodide, indicating viability loss (B).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that primarily aimed to evaluate the effect of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition in horse embryos. Although embryos were not incubated in a CO_2 atmosphere, the morphologic characteristics of the blastocysts maintained in Holding medium for 24 h indicate that incubation system provides conditions to sustain embryo viability. This finding is in accordance with a report from Clark *et al.* (1987), whose indicate that horse embryos stored in MEM at 37°C during 12 h displayed normal development.

The exposition of three blastocysts to ouabain during 6 h, resulting in blastocoel collapse and no subsequent reexpansion, even after 12 h incubated in Holding (without ouabain), indicates that Na^+ , K^+ -ATPase plays a crucial role on blastocoel sustain during this embryonic stage. Waelchli *et al.* (1997), evaluating trophoblastic vesicles from horse

embryos, reported that 78% of vesicles collapsed after Na^+ , K^+ -ATPase inhibition with ouabain. Although Waelchli *et al.* (1997) study focused on trophoblastic vesicles, the authors cited that D9 horse blastocysts partially collapsed after ouabain exposition (10^{-6} M), with further reexpansion in ouabain free medium in a pilot study, which as not observed in the present study.

We demonstrated that ouabain, a specific Na^+ , K^+ -ATPase inhibitor, is able to reduce D7 and D9 horse blastocyst diameter, interfering with the fluid exchange through trophoctoderm, similarly to Waelchli *et al.* (1997) report in D9 horse embryo. It is noteworthy that Na^+ , K^+ -ATPase can be found in embryos of different species, under several isoforms, depending on α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$) or β ($\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$) subunits that comprise the protein (Câmara *et al.*, 2017). Although Budik *et al.* (2008) reported an absence or minimal expression of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of Na^+ , K^+ -ATPase in D8 horse embryos, and a remarkable rising in D10, the present study demonstrated that horse embryo is influenced by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition as early as D7. As ouabain concentration used in the present study (10^{-6} M) is able to inhibit $\alpha 1$ subunit, which comprises Na^+ , K^+ -ATPase isoform less sensitive to ouabain (Blanco, 2005), it is feasible that other isoforms could be also inhibited, since Betts *et al.* (1997) demonstrated that bovine embryos express $\alpha 3$ subunit of Na^+ , K^+ -ATPase since morulae stage.

The use of OuabainFL assured that ouabain was able to bind horse blastocyst. Concurrently, in spite of ouabain type (isolated or ouabainFL), lower exposition time to ouabain (1 h), and embryonic stage (D7 or D9 blastocyst), there was a reduction on blastocyst diameter and adverse effects on morphology after Na^+ , K^+ -ATPase inhibition. Furthermore, damage on trophoblastic membranes was demonstrated, since PI is capable of crossing only damaged cell membrane (Van Engeland *et al.*, 1998; Willingham, 1999), reinforcing the negative morphologic aspects of the blastocysts.

It is known that blastocyst expands by the continuous fluid movement through trophoctoderm, but it does not happen until tight junctions (TJ) are fully developed and functional between trophoctoderm cells, maintaining blastocoel fluid and epithelial integrity (Watson and Barcroft, 2001). We inferred that functional inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase interfered with the formation/function of TJ on trophoblastic cells, which allowed that IP crosses the membrane. On previous studies, inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase resulted in increased intracellular Na^+ levels, inhibition of Na^+ , Ca^{2+} ionic channel and an elevation of intracellular Ca^{2+} and AMPc, compromising E-cadherin/catenin system leading to TJ

disruption and impairment of cell membrane polarization control (Eckert *et al.*, 2008; Rajasekaran *et al.*, 2001), culminating with trophectoderm membrane damages.

CONCLUSION

Studies at molecular levels are necessary to evaluate the effects of Na⁺, K⁺-ATPase inhibition on tight junctions structure and function in horse embryos. However, it was concluded that Na⁺, K⁺-ATPase inhibition with ouabain is not recommended aiming chemical reduction of horse blastocyst size, due to embryonic death.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thanks to Minitube Brazil, on behalf of Marcio Menezes Nunes. Haras Malícia, on behalf of Pedro Acioli Filho and Agnelo Douglas do Nascimento. Dr. André Mariano Batista, for technical support throughout research.

REFERENCES

- AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v. 48, p. 185–192, 1997.
- ALVARENGA, M. A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 38, p. s319-s333, 2010. Suplemento 1.
- BLANCO, G. Na, K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Sem. Neph.*, v. 25, p. 292–303, 2005.
- BETTS, D.H.; MACPHEE, D.J.; KIDDER, G.M.; WATSON, A.J. Ouabain Sensitivity and Expression of Na/K-ATPase α and β Subunit isoform genes during bovine early development. *Mol. Reprod. Dev.*, v.46, p.114–126, 1997.
- BUDIK, S.; WALTER, I.; TSCHULENK, W.; HEMLRICH, M. *et al.* Significance of aquaporins and sodium potassium ATPase subunits for expansion of the early equine conceptus. *Reproduction.*, v.135, p.497-508, 2008.
- CÂMARA, D.R.; KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Role of the Na⁺, K⁺-ATPase ion pump on male reproduction and embryo development. *Reprod. Fertil. Develop.*, v. 29(8), p. 1457-1467, 2017.

- CHOI, Y.H.; GUSTAFSON-SEABURY, A.; VELEZ, I.C. *et al.* Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction*, v.140,p.893-902, 2010.
- CHOI, Y.H.; VELEZ, I.C.; RIERA, F.L. *et al.* Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* v.76, p.143-152, 2011.
- CLARK, K.E.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; SEIDEL Jr, G.E. Viability of stored equine embryos. *Anim.Sci.* v.65, p.534-542,1987.
- DOBRINSKY, J.R.; PURSEL, V.G.; LONG, C.R.; JOHNSON, L.A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* v.62, p.564-570, 2000.
- ECKERT, J.J.; FLEMING, T.P. Tight junction biogenesis during early development. *Acta Biochim. Biophys.*, v.1778, p.717–728, 2008.
- GIANNATSELIS, H.; CALDER, M.; WATSON, A.J. Ouabain stimulates a Na⁺, K⁺-ATPase-mediated SFK-activated signalling pathway that regulates tight junction function in the mouse blastocyst. *Plos One*, 6(8): e23704, 2011.
- HOCHI, S.; MARUYAMA, K.; OGURI, N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology*, v.46, p. 1217-1224. 1996.
- LEGRAND, E.; KRAWIECKI, J.M.; TAINURIER, P.D. *et al.* Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos?. Proceedings of the 5th international symposium on equine embryo transfer, *Havemeyer Foundation Monograph Series.*, v.3, p.62-65, 2001.
- MACLELLAN, L. J.; CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A. *et al.* Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology* v.58, p.717-720, 2002.
- MANEJWALA, F.M.; CRAGOE Jr, E.J.; SCHULTZ, R.M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: Role of extracellular sodium and chloride and possible apical routes of their entry. *Develop. Biol.*, v.133, p. 210–220, 1989.
- MCCUE, P. M.; BARFIELD, J. P.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. J. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiol.*, v.59(1), p. 36-41, 2009.
- RAJASEKARAN, S.A.; PALMER, L.G.; MOON, S.Y. *et al.* Na, K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells, *Mol. Biol. Cell*,v.12, p. 3717, 2001.

- SAMPER, J.C. Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. In: *Proceedings of the 43rd Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract.*, p.41–43, 1997.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods.*, v.9, p.671-675, 2012.
- STOUT, T.A. Cryopreservation of equine embryos: current state of the art. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.84-89, 2012.
- VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim. Reprod. Sci.* v.92, p.211-230, 2006.
- VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.; RAMAEKERS, F.C. *et al.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, v.31, p.1-9, 1998.
- WAELECHLI, R.O.; MACPHEE, D.J.; KIDDER, G.M., BETTERIDGE, K.J Evidence for the presence of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase alpha1 and beta1 subunit isoforms and their probable role in blastocyst expansion in the preattachment horse conceptus. *Biol. Reprod.*, v.57, p. 630–640, 1997.
- WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. *Front. Biosc.*, v.6, p. 708–730, 2001.
- WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, v.47, n.9, p.1101-1109, 1999.
- YAMAMOTO, Y.; OGURI, N.; TSUTSUMI, Y.; HACHINOHE, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.32, p.399-403, 1982.

REFERÊNCIAS

- ALBIHN, A., et al. Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice. **Reproduction**. v.125, p.855-863, 2003.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Anim. Reprod. Sci.** v.107, p.268-275, 2008.
- AURICH, J. E. Artificial insemination in horses—More than a century of practice and research. **J. Equine Vet. Sci.** v.32, p.458-463, 2012.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**. v.121, p.513-527, 2001.
- ARAUJO, G. H. M., ROCHA FILHO, A. N., BURNS, S. D., MOYA-ARAUJO, C. F., MEIRA, C. Pregnancy rates after vitrification, warming and transfer of equine embryos. 10th international symposium on equine reproduction, Lexington KY. p S299-S300, 2010.
- APELL, H. J. How do P-type ATPases transport ions? **Bioelectrochemistry**, v.63, p.149–156, 2004.
- BIGGERS J.D, BELL, J.E. BENOS, D.J. Mammalian Blastocyst: transport functions in a developing epithelium. **Am. J. Physiol**, v.255,p.C419-C432, 1988.
- BEG, M. A., O. J. GINTHER. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v.132, p.365-377, 2006.
- BERGFELT, D. R. GASTAL, E. L. GINTHER, O. J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biol. Reprod.** v.65, p.426-432, 2001.
- BETTERIDGE, K. J. EAGLESOME, M. D. MITCHELL, D. FLOOD, P. F. BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **J. Anat**, v.135, p.191-209, 1982.
- BETTERIDGE, K. J. WAELCHLI, R. O. Equine embryo encapsulation: ephimeral, essential and charismatic. In: Maternal recognition of pregnancy III, 13th – 16th November, 2004. T. A. E. Stout and J. F. Wade, Barbados, West Indies, p.47-59.
- BETTERIDGE, K. J. Embryo morphology, growth and development. In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala and D. D. Varner (eds.) Equine reproduction. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Chichester, UK. p 2167-2186, 2011.
- BEZARD, J., MAGISTRINI, M. DUCHAMP, G. PALMER, E. Chronology of equine fertilisation and embryonic development in vivo and in vitro. **Equine Vet. J.** v.21, p.105-110, 1989.

BETTS, D.H. MACPHEE, D.J. KIDDER, G.M. WATSON, A.J. Ouabain sensitivity and expression of Na/K-ATPase α - and β -subunit isoform genes during bovine early development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.114–126, 1997

BETTS, D.H. BARCROFT, L.C. WATSON, A.J. Na/K-ATPase-mediated $^{86}\text{Rb}^+$ uptake and asymmetrical trophectoderm localization of $\alpha 1$ and $\alpha 3$ Na/K-ATPase isoforms during bovine preattachment development. **Dev. Biol.**, v.197, p.77–92, 1998.

BRINSKO, S. P. RIGBY, F. C. LINDSEY, A. C. BLANCHARD, T. L. LOVE, C. C. D. VARNER, D. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. **Theriogenology**, v. 59, p.1001-1009, 2003.

BRINSKO, S. P. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v.66, p.543-550, 2006.

BRINSKO, S. Semen extenders for cooled semen (North America). In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala and D. D. Varner (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011b, p 1341-1343.

BRINSKO, S. Semen collection techniques and insemination procedures. In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala and D. D. Varner (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011a, p 1268-1277.

BIERKAMP, C. MCLAUGHLIN, K.J. SCHWARZ, H. HUBER, O, KEMLER, R. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. **Dev. Biol.**, v.180, p.780–785, 1996.

BUDIK, S. WALTER, I. TSCHULENK, W. HELMREICH, M. DEICHSEL, K. PITTLNER, F. AURICH, C. Significance of aquaporins and sodium potassium ATPase subunits for expansion of the early equine conceptus. **Reproduction**, v.135, p.497-508, 2008.

BARFIELD, J. P. MCCUE, P. M. SQUIRES, E. L. SEIDEL, G. E. J. Effect of Dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. **Cryobiology**, v.59, p.36-41, 2009.

BARFIELD, J. P. LEIBO, S. P. MCCUE, P. M. SEIDEL, G. E. Osmotic responses of equine embryos with and without capsules to cryoprotectants. **Reprod. Fertil. Develop.**, v.23, p.139-140, 2010.

BASS, L. D. DENNISTON, D. J. MACLELLAN, L. J. MCCUE, P. M. SEIDEL, G. E. SQUIRES, E. L. Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1153-1159, 2004.

BLANCO G, SANCHEZ, G. MERCER, R.W. Comparison of the enzymatic properties of the Na/K-ATPase $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 3 \beta 2$ isozymes. **Biochemistry**. v.34, p.9897-9903, 1995.

BLANCO, G. MERCER, R.W. Isozymes of the Na-KATPase: heterogeneity in structure, diversity and function. **Am J Physiol**, v.275, p.F633-F650, 1998.

BARCROFT, L.C. MOSELEY, A.E. LINGREL, J.B. WATSON, A.J. Deletion of the Na/K-ATPase alpha1-subunit gene (Atp1a1) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. **Mech. Dev.** v.121, p.417– 426, 2004.

CAVENDER, J. L. MURDOCH, W. J. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. **Biol. Reprod**, v.39, p.989-997, 1988.

CARNEVALE, E. M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

CARNEY, N. J. SQUIRES, E. L. COOK, V. M. SEIDEL JR, G. E. JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v.36, p.23-32, 1991.

CHOI, Y., et al. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. **Theriogenology**, v.76, p.143-152, 2011b.

CHOI, Y., et al. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.455-465, 2002.

CROWELL-DAVIS, S. L. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, v.52, p.12-17, 2007.

CONTRERAS, R. G., et al. A novel type of cell-cell cooperation between epithelial cells. **J. Membr. Biol**, v.145, p.305-310, 1995b.

CONTRERAS, R.G. SHOSHANI, L. FLORES-MALDONADO, C. LAZARO, A., CERIJIDO, M. Relationship between Na(p),K(p)-ATPase and cell attachment. **J. Cell Sci**, v.112, p.4223–4232, 1999.

CUERVO-ARANGO, J. NEWCOMBE, J. R. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. **Theriogenology**, v.69, p.681-687, 2008.

CURRY, M. R. EADY, P. E. MILLS, D. S. Reflections on mare behavior: social and sexual perspectives. **J. Vet. Behav: Clin. Applicat. Res**, v.2, p.149-157, 2007.

DE SOUSA, P. A. WESTHUSIN, M. E. WATSON, A. J. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. **Mol. Reprod. Dev**, v.49, p.119–130, 1998.

DIAZ, F. J. et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Mol. Cell. Endo**, v.191, p.65-80, 2002.

DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.

DOBRINSKY, J. R. PURSEL, V. G. LONG, C. R. JOHNSON, L. A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biol. Reprod**, v.62, p.564-570,2000.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.et al,. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304,1984.

DONNAY, I. LEESE,H. J. Embryo metabolismduring the expansion of the bovine blastocyst. **Mol. Reprod. Dev**, v.53, p.171–178, 1999.

DONADEU, F. X GINTHER, O. J. Interrelationships of estradiol, inhibin, and gonadotropins during follicle deviation in pony mares. **Theriogenology**, v.61, p.1395-1405, 2004.

DUCIBELLA T, ANDERSON, E. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. **Dev Biol**, v.47, p.45-58, 1975.

DIZIO S.M, & R.J. TASCA: Sodium-dependent aminoacid transport in preimplantation mouse embryos III: Na/KATPase linked mechanism in blastocysts. **Dev. Biol**, v.59,p.198-205, 1977.

DALCIN, L. LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.149-159, 2010.

DULCIBELA, T. DUFFY, P. REINDOLLAR, R. SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin stimulated meiotic maturation and aging in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 870-876, 1990.

EILTS, B. E. PUBERTY. In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala and D. D. Varner (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011, p.1689-1695.

ELDRIDGE-PANUSKA, W. D. CARACCIOLO DI BRIENZA, V. SEIDEL, G. E. SQUIRES, E. L. CARNEVALE, E. M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1308-1319, 2005.

EDMONDS D, K. LINDSAY, K.S. MILLER, J.F. WILLIAMSON, E. WOOD, P.J. Early embryonic mortality in woman. **Fert. Steril**, v.38, p.447-453,1982.

EDWARDS R.G. Recent scientific and medical advances in assisted human conception. **Inter J Dev Biol**, v.41, p.255-262,1997.

ELSTER A.L et al,. ART into science: regulation of fertility techniques. **Science**, v.28,p.1651-652, 1998.

FARIN, C. E. FARMER, W. T. FARIN, P. W. Pregnancy recognition and abnormal offspring syndrome in cattle. **Reprod. Fertil. Dev.** v.22, p.75–87, 2010.

FLEMING, T.P. WARREN, P.D. CHISHOLM, J.C. JOHNSON, M.H. Trophectodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst. **J. Embryol. Exp. Morphol**, v.84, p.63– 90, 1984.

FLEMING T.P: Trapped by a skeleton-the maintenance of epithelial membrane domains. **BioEssays**, v.7, p.179-181, 1987.

FLEMING, T.P. GARROD, D.R. ELSMORE, A.J. Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation embryo. **Development**, v.112, p.527–539, 1991.

FLEMING, T.P. GHASSEMIFAR, M.R. SHETH, B. Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Semin. Reprod. Med*, v.18, p.185–193, 2000a.

FLEMING T.P PAPENBROCK, T. FESENKO, I. HAUSEN, P. SHETH, B. Assembly of tight junctions during early vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol*, v.11, p.291-299, 2000b.

FLEMING, T.P. SHETH, B. FESENKO, I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophoctoder differentiation anvvd blastocyst morphogenesis. **Front. Biosci**, v.6, p.D1000–D1007, 2001.

FREEMAN, D. A. J. A. WEBER, GEARY, R. T. WOODS, G. L. Time of embryo transport through the mare oviduct. **Theriogenology**, v.36, p.823-830, 1991.

FREEMAN, D. A., WOODS, G. L. VANDERWALL, D. K. WEBER, J. A. Embryoinitiated oviductal transport in mares. **J. Reprod. Fertil**, v.95, p.535-538, 1992.

FRAENKEL, L. Die Function des Corpus luteum. Arch. Gynak. **Archiv für Gynaekologie**, v.68, p.438-545, 1903.

GALLI, C. et al,. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Anim. Reprod. Sci**, v.98, p.39-55, 2007.

GASTAL, E. L. GASTAL, M. O. BERGFELT, D. R. GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biol. Reprod**, v.57, p.1320-1327, 1997.

GASTAL, E. L. GASTAL, M. O. GINTHER, O. J. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol. Reprod*, v.61, p.724-730, 1999a.

GASTAL, E. L. GASTAL, M. O. WILTBANK, M. C. GINTHER, O. J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biol. Reprod**, v.61, p.31-39, 1999b.

GASTAL, E. L., GASTAL, M. O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.35, p.239-252, 2011.

GARDINER, C. S. WILLIAMS, J. S. MENINO, A. R. Sodium/potassium adenosine triphosphate α - and β -subunit and α -subunit mRNA levels during mouse embryo development *in vitro*. **Biol. Reprod**, v.43, p. 788–794, 1990.

GLYNN, I.M. A hundred years of sodium pumping. *Annu. Rev. Physiol*, v.64, p. 1–18, 2002.

GILLARD KINGMA, S. E. et al., Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol *in vitro*. *Theriogenology*, v.76, p.1540-1551, 2011.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare : basic and applied aspects. Equiservices, Cross Plains, WI. 1992.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim. Reprod. Sci**, v.60–61, p.61-79, 2000.

GINTHER, O. J., M. A. BEG, F. X. DONADEU, AND D. R. BERGFELT. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O. J. BEG, M. A. GASTAL, M. O. GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.1, p.45-63, 2004.

GINTHER, O. J. BEG, M. A. Hormone concentration changes temporally associated with the hour of transition from preovulation to ovulation in mares. **Anim. Reprod. Sci**, v.129, p.67-72, 2011.

GINTHER, O. J. GASTAL, E. L. GASTAL, M. O. BEG, M. A. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? **J. Equine Vet. Sci**, v.8, p.454-460, 2008.

GORDON, I. Controlled reproduction in horses, deer and Camelids. CAB [Centre for agriculture and biosciences] International, Wallingford; New York, 1997.

GOUDET, G. Fertilisation in the horse and paracrine signalling in the oviduct. **Reprod. Fertil. Develop**, v.23, p.941-951, 2011.

GRIFFIN, J. L. CASTLEBERRY, R. S. SCHNEIDER JR, H. S. Influence of day of collection on recovery rate in mature cycling mares. **Theriogenology**, v.15: p.106. 1981.

GRONDAHL, C. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation *in vivo*. **Mol. Reprod. Dev**, v.42, p.94-105, 1995.

GRONDAHL, C. et al., In-vivo fertilisation and initial embryogenesis in the mare. **Equine Vet. J**, v.25, p.79-83,1993.

GIANNATSELIS, H. CALDER, M. WATSON, A. J. Ouabain stimulates a Nap/Kp-ATPase-mediated-SFK-activated signalling pathway that regulates tight junction function in the mouse blastocyst. **PLoS One**, v.6, 2011.

GRIFFIN, J. L. CASTLEBERRY, R. S. SCHNEIDER JR, H. S. Influence of day of collection on recovery rate in mature cycling mares. **Theriogenology**, v.15,p.106, 1981.

GORDON I. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In: Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK.1994. p.293-328.

GUENET J.L. SIMON-CHAZOTTES, D. RINGWALD, M. KEMLER, R. The genes coding for alpha and beta catenin (Catnal and Catnab) and plakoglobin (Jup) map to mouse chromosomes 18, 9, and 11, respectively. **Mamm Genome**, v.6, p.363-366, 1995.

GUMBINER B.M. MCCREA P.D. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. **J Cell Science**, v.17,p.155-158, 1993.

HAEGEL, H, LARUE, L. OHSUGI, M. FEDOROV, L. HERRENKNECHT, K. KEMLER, R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. **Development**, v.121, p.3529-3537,1995.

HARTMAN, D. L. Embryo transfer. In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala Na-d D. D. Varner (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 2011.p 2871-2879.

HEAPE, W. 1898. On the artificial insemination of mares. *Veterinarian* 71: 201-212.

HICKEY, K. D. BUHR, M. M. Characterization of NapKp-ATPase in bovine sperm. **Theriogenology**, v.77, p.1369–1380, 2012.

HINRICHS, K. CHOI, Y.H. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clin.Tec. Equine Pract**, v.4, p. 210-218, 2005.

HINRICHS, K. et al.,Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. **Reproduction**, v.131, p.1063-1072, 2006.

HINRICHS, K. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reprod. Fertil. Develop**, v.25, p.80-93, 2012.

HOCHI, S. MARUYAMA, K. OGURI, N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. **Theriogenology**, v.46, p.1217-1224, 1996.

HOUSEHOLDER, D. D., B. W. PICKETT, J. L. VOSS, AND T. T. OLAR. 1981. Effect of extender, number of Spermatozoa and HCG on equine fertility. **J. Equine Vet. Sci**, v.1, p.9-13,1981.

HOUGHTON, F. D. HUMPHERSON, P. G. HAWKHEAD, J. A. HALL, C. J. LEESE, H. J. Nap,Kp-ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. **Dev. Biol**, v.263, p.360–366,p.9-13, 2003.

HUNTER, R. H. F. Physiology of the Graafian follicle and ovulation. Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York, NY. 2003.

HOSCHUETZKY H, ABERLE, H. KEMLER,R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. **J Cell Biol**, v.127,p.1375-1380, 1994.

HUBER O, BIERKAMP, C.KEMLER, R. Cadherins and catenins in development. **Curr Opin Cell Biol**, v.8, p.685-691, 1996.

HYNES R.D: Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. **Curr Opin Genes Dev**, v.2, p.621-624,1992.

IULIANO, M. F. SQUIRES, E. L. COOK, V. M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **J. Anim. Sci**, v.60, p.258-263, 1985.

JACOB, J. C. F. HAAG, K. T. SANTOS, G. O. OLIVEIRA, J. P. GASTAL, M. O. GASTAL, E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.77, p.1159-1166, 2012.

JORGENSEN, P. L. HAKANSSON, K. O. KARLISH, S. J. D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol*, v.65, 817–849, 2003.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Anim. Reprod. Sci**, v.42, p.67-75, 1996.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. **Reprod. Med. Biol**, v. 1, p.1-9, 2002.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem*, v.71,p. 511–535,2002.

KELLY, J. M. MCBRIDE, B. W. The sodium pump and other mechanisms of thermogenesis in selected tissues. **Proc. Nutr. Soc**, v.49, p.185–202,1990.

KENNEY, R. M. et al.,Minimal contamination techniques for breeding mares. Technique and preliminar findings. Proceedings of the 21st Annu. Conv. Am. Assoc. Equine. Pract. p 327-336, 1975.

KIDDER, G.M. Genes involved in cleavage, compaction, and blastocyst formation. In. *Genes in Mammalian Reproduction*. Ed: Gwatkin, R.B.L, J. Wiley and Sons. New York.1992. p. 45-71.

KEMLER, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. **Trends in Genetics**, v.9, p.317-321, 1993.

KAIBUCHI K, KURODA, S. FUKATA, M. NAKAGAWA, M. Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. **Curr Opinion Cell Biol**, v.11, p.591-596, 1999.

KURODA S, FUKATA, M. NAKAGAWA, M. KAIBUCHI, K. Cdc42, Rac1, and their effector IQGAP1 as molecular switches for cadherin-mediated cell-cell adhesion. **Biochem Biophys Res Comm**, v.262, p.1-6, 1999.

KURODA, S. et al,. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. **J Biol Chem**, v.271, p.23363-23367, 1996.

LAGNEAUX, D. et al,.Effect of L-glutamine for freezing equine embryos: evaluation by DAPI staining and transfer of multiple embryos to recipient mares. **J. Reprod. Fertil**, v.56, p.561-568. 2000.

LARUE, L. OHSUGI, M. HIRCHENHAIN, J. KELMER,R. Ecadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. **Proc Natl Acad Sci**, v.91, p.8263-8267, 1994.

LAGNEAUX, D. et al,. Effect of L-glutamine for freezing equine embryos: evaluation by DAPI staining and transfer of multiple embryos to recipient mares. **J. Reprod.Fertil**, v.56, p.561-568, 2000.

LEGRAND, E. et al,.Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? Proceedings of the 5th international symposium on equine embryo transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series, v.3, p.62-65, 2001.

LEIBO, S. P. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. **Cryo letters**, v.4,p.387-400,1983.

LEIBO, S. P. POOL,T. B. The principal variables of cryopreservation: solutions,temperatures, and rate changes. **Fertil. Steril**, v.96,p.269-276, 2011.

LEITH, G. S. GINTHER, O. J. Mobility of the conceptus and uterine contractions in the mare. **Theriogenology**, v.24, p.701-711, 1985.

LYLE, S. K. FERRER, M. S. Low-dose insemination—why, when and how. **Theriogenology**, v.64, p.572-579, 2005.

LINGREL, J. B. KUNTZWEILER, T. Nap,Kp-ATPase. **J. Biol. Chem**, v.269, p.659 662, 1994.

LUCAS, T. F. G. AMARAL, L. S. PORTO, C. S. QUINTAS, L. E. M. Na⁺/K⁺-ATPase α 1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells. **Reproduction**, v.144, p.737–745, 2012.

LOFSTEDT, R. M. DIETRUS. IN: A. O. MCKINNON, E. L. SQUIRES, W. E. VAALA AND D. D. VARNER (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011. p.1728-1731.

MADAN, P. ROSE, K. WATSON, A.J. Na/K-ATPase β 1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins, **J. Biol. Chem**, v.282, p.12127, 2007.

MANEJWALA F.M. CRAGOE JR, E.J. SCHULTZ, R.M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: role of extracellular sodium and chloride and possible routes of their entry. **Dev Biol**, v.133, p.210-220, 1989.

MCCREA, P.D. TURCK, C.W. GUMBRINER, B. A homologue of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. **Science**, v.254, p.1359-1361, 1991.

MASSIP A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod Domest Anim**, v.36, p.49-55, 2001.

MACLELLAN, L. et al,. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. **Theriogenology**, v.58, p.717-720, 2002.

MARINIER, S. L. ALEXANDER, A. J. WARING, G. H. Flehmen behaviour in the domestic horse: discrimination of conspecific odours. *Appl. Anim. Behav. Sci*, v.19, p.227-237, 1988.

MCCUE, P. M. SCOGGIN, C. F. LINDHOLM, R. G. ESTRUS. IN: A. O. MCKINNON, E.L. SQUIRES, W. E. VAALA AND D. D. VARNER (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011. p 1716-1727.

MCDOWELL, K. J. SHARP, D. C. MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY. IN: A. O.MCKINNON, E. L. SQUIRES, W. E. VAALA AND D. D. VARNER (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011.p.2200-2210.

MCKINNON, A. O. CARNEVALE, E. M. SQUIRES, E. L. CARNEY, N. J. SEIDEL, G. E. Bisection of equine embryos. **J.Equine Vet**, v.21, p.129-133,1989.

MERKL, M. et al,. Microarray Analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. **Biol. Reprod**, v.83, p.874-886, 2010.

MIHM, M. EVANS, A. C. O. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. **Reprod. Dom.Anim**, v.43, p.48-56, 2008.

MORRIS, L. H. A. Low dose insemination in the mare: an update. **Anim. Reprod. Sci**, v.82–83, p.625-632, 2004.

MUKAIDA, T. OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v.26, p.789-803, 2012.

MURPHY, B. D. Models of Luteinization. **Biol. Reprod.** v.63, p.2-11, 2000.

MCDERMOTT, J. SÁNCHEZ, G. NANGIA, A. K. BLANCO, G. Role of human Na/K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. **Mol.Reprod.Dev**, v.82, p.1173-1178, 2015.

MARIKAWA, Y. ALARCON, V. Creation of trophectoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development. *Results Probl. Cell Differ*, v.55, p.165–184, 2012.

MORIWAKI, K. TSUKITA, S. FURUSE, M. Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. **Dev. Biol**, v.312, p.509–522, 2007.

NISWENDER, G. D. et al,. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod**, v.50, p.239-247, 1994.

O'SHEA, J. D. CRAN, D. G. HAY, M. F. Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. **Cell Tissue Res**. v.210, p.305-319, 1980.

OHLETH, K. M. BAGNELL, C. A.. Relaxin secretion and gene expression in porcine granulosa and theca cells are stimulated during in vitro luteinization. **Biol. Reprod**, v.60, p.499-507, 1999.

ORIOLO, J. G. SHAROM, F. J. BETTERIDGE, K. J. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **J. Reprod. Fertil**, v.99, p.653-664,1993.

PFAFF, R. SEIDEL, G. E. SQUIRES, E. L. JASKO, D. J. Permeability of equine blastocysts to ethylene glycol and glycerol. **Theriogenology**, v.39, p.284,1993.

PICKETT, B. W. SHINER, K. A. Recent developments in artificial insemination in horses. *Livest. Prod. Sci*, v.40, p.31-36,1994.

PICKETT, B. W. VOSS, J. L. The effect of semen extenders and sperm numbers on mare fertility. **Reprod Fertil**, v.23, p.95-98, 1975.

POITRAS, P. et al,. In vitro viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. **Can. J. Vet. Res**, v.54, p.235-241, 1994.

PENG, M. et al,. Partial inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain induces the Ca²⁺-dependent expression of early-response gene in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem**, v.271, 10 p.372–10 378, 1996.

PEREIRA, R.M. MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v. 9, p. 267-277, 2008.

PICKETT, B. W. SHINER, K. A. Recent developments in artificial insemination in horses. *Livest. Prod. Sci.*, v.40, p.31-36, 1994.

RALL, W. F. FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at degrees C by vitrification. **Nature**, v.313, p.14-20, 1985.

RAJASEKARAN, A.K. HOJO, M. HUIMA, T. RODRIGUEZ-BOULAN, E. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. **J Cell Biol**, v.132, p.451–463, 1996.

RAJASEKARAN, S.A. et al., Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. **Mol Biol Cell**, v.12, p.3717–3732, 2001a.

RAJASEKARAN, S.A. et al., Na,K-ATPase-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility. **Mol Biol Cell**, v.12, p.279–295, 2001b.

REYES, N. GADSBY, D. C. Ion permeation through the Na₂K₂P-ATPase. **Nature**, v.443, p.470–474, 2006.

RIETHMACHER D, BRINKMAN, V. BIRCHMEIER, C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p.855-859, 1995.

REUTHER G.W, DER, C.J. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. **Curr Opin Cell Biol**, v.12, p.157-165, 2000.

REYNOLDS, L. GRAZUL-BILSKA, A. REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v.12, p.1-9, 2000.

RICHARDS, J. S. LIU, Z. SHIMADA, M. Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends Endocrinol. Metab*, v.19, p.191-196, 2008.

RICHARDS, J. S. RUSSELL, D. L. OCHSNER, S. ESPEY, L. L. Ovulation: new dimension and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu. Rev. Physiol*, v.64, p.69-92, 2002.

ROBERTO DA COSTA, R. P. BRANCO, V. PESSA, P. SILVA, J. R. FERREIRA-DIAS, G. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue. **Reprod. Fertil. Develop**, v.17, p.659-666, 2005.

RODRIGUEZ, A. et al., Retinoids during the *in vitro* transition from bovine morula to blastocyst. **Hum. Reprod**, v.21, p. 2149–2157, 2006.

SANDTNER, W. et al., Ouabain binding site in a functioning Na₂K₂P-ATPase. *J. Biol. Chem*, v.286, p.177-183, 2011.

SAMPER, J. Breeding with cooled transported semen. In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala and D. D. Varner (eds.) *Equine reproduction*. 2nd ed . Wiley-

Blackwell . Chichester, UK. 2011. p.1316-1322.

SARAGUSTY, J. ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.

SCHERZER, J. DAVIS, C. HURLEY, D. J. Laser-assisted vitrification of large equine embryos. **Reprod. Domest. Anim**, v.46, p.1104-1106, 2011.

SENGER, P. L. Puberty. In: P. L. Senger. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions Inc., Ephrata, PA. 2003a. p.128-143.

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

SMITH, M. F. MCINTUSH, E. W. SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **J. Anim. Sci**, v.72, p.1857-1872, 1994.

SQUIRES, E. L. IULIANO, M. F. SHIDELER, R. K. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.17, p.35-41, 1982.

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

SQUIRES, E. L. CARNEVALE, E. M. MCCUE, P. M. BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E. L. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? **J. Equine Vet. Sci**, v.29, p.268-273, 2009.

SHINODA, T. OGAWA, H. CORNELIUS, F. TOYOSHIMA, C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. **Nature**, v.459, p.446-450, 2009.

SQUIRES, E. L. WILSON, J. M. KATO, H. BLASZCZYK, A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v.45, p.306, 1996.

STOUT, T. A. E. MEADOWS, S. ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Anim. Reprod. Sci**, v.87, p.269-281, 2005.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Vet. J**, v.38, p.467-478, 2006.

STOUT, T. A. E. Cryopreservation of equine embryos: current state of the art. **Reprod. Domest. Anim**, v.47, p.84-89, 2012.

STOOKEY, J.M. MAPLETOFT, R.J. Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção *in vivo* de embriões. In:

Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. Champaign, IL: IETS, p. 180, 1998.

SCHULTZ R.M: Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **Bio Essays**, v.15, p.531-538,1993.

SARAGUSTY, J. ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.

TORRES, M. et al,. An alpha E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.901-906, 1997.

TREMOLEDA, J. L.et al,. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. **Biol. Reprod**, v.69,p.1895-1906,2003.

VAJTA G, NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006.

VAN NIEKERK, C. MORGENTHAL, J. C. GERNEKE, W. H.. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **J.Reprod. Fertil**, v.23, p.171-175,1975.

VANDERWALL, D. Current equine embryo transfer techniques. In: B. A. Ball (ed.) Recent advances in equine theriogenology. International Veterinary information services. 2000. P.A0204,0400.

VANDERWALL, D. K. Progesterone. In: A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala and D. D. Varner (eds.) Equine reproduction. 2nd ed . Wiley-Blackwell . Chichester, UK. 2011. p.1637-1641.

VARNER, D. et al,. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v.50, p.559-573,1998.

VIDAMENT, M. et al,. Temperatures from 4 to 15 °C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. **Theriogenology**, v.78, p. 297-307, 2012.

VIOLETTE, M.I. MADAN, P. WATSON, A.J. Na⁺/K⁺-ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development. **Dev. Biol**, v.289, p.406, 2006.

WATSON, A.J. et al,. Expression of Na/K-ATPase alpha and beta subunit genes during preimplantation development of the mouse. **Dev Genet**, v.11, p.41-48, 1990.

WATSON A.J. HOGAN, A. HAHNEL, A.SCHULTZ, G.A. Activation of the embryonic genome:comparisons between mouse and bovine development. In: Proceedings of the Sero Symposium on Preimplantation Embryo Development. Eds: Bavister BD, Springer-Verlag, New York. 1992b.

WATSON, A.J. BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience*, v.6, p. 708–730, 2001.

WATSON, A.J. DAMSKY, C.H. KIDDER, G.M. Differentiation of na epithelium: factors affecting the polarized distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in mouse trophectoderm. *Dev. Biol*, v.141, p.104–114, 1990a.

WATSON, A.J. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev*, v.33,p.492-504,1992.

WASSARMAN, P.M. ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. Edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, Ltd, New York, 1994, p.79-122.

WEBER, J. A. FREEMAN, D. A. VANDERWALL, D. K. WOODS, G. L.. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol. Reprod*, v.45, p.544-546,1991a.

WEBER, J. A. FREEMAN, D. A. VANDERWALL, D. K. WOODS, G. L. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol. Reprod*, v.45, p.540-543, 1991b.

WILTBANK, M. C., R. C. DYSKO, K. P. GALLAGHER, AND P. L. KEYES. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *J. Reprod. Fertil*, v.84,p.513-520, 1988.

WAELECHLI, R.O. MACPHEE, D.J. KIDDER, G.M. BETTERIDGE, K.J. Evidence for the presence of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase alpha1 and beta1 subunit isoforms and their probable role in blastocyst expansion in the preattachment horse conceptus. *Biol. Reprod.*, v.57, p.630–640, 1997.

WILEY, L.M. KIDDER, G.M. WATSON, A.J. Cell polarity and development of the first epithelium. *BioEssays*, v.12, p.67-73,1990.

WILEY, L.M. Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of the nascente blastocoelic fluid. *Dev Biol*, v.105, p.330-342,1984.

WILLETT, E.L. et al., Successful transplantation of a bovine ovum. *Science*, v.113,p. 247,1951.

WOO, A. L., JAMES, P. F. LINGREL, J. B.. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na/K-ATPase. *J. Biol. Chem*, v.275, p.20693-20699, 2000.

WEBER, J. A., FREEMAN, D. A. VANDERWALL, D. K. WOODS, G. L. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol. Reprod*, v.45, p.544-546, 1991a.

WEBER, J. A. FREEMAN, D. A. VANDERWALL, D. K. WOODS, G. L.. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol. Reprod*, v.45, p.540-543, 1991b.

WOO A. L., JAMES P. F., LINGREL J. B. Characterization of the fourth alpha isoform of the Na,K-ATPase. *J. Membr. Biol*, v.169, p.39–44, 1999.

YAMAMOTO, Y. OGURI, N. TSUTSUMI, Y. HACHINOHE, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil*, v.32, p.399-403, 1982.

YAVIN S, ARAV A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, v.67, p.81-89, 2007.

ANEXOS

ScholarOne Manuscripts
<https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> 1/2

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

• [Print](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Manuscript ID

ABMVZ-2018-11031

Title

Na⁺, K⁺ -ATPase inhibition is detrimental to horse blastocyst

Authors

Nascimento, Agnelo

Marques, Juliana Carla

cezar, Allan rodolf

Câmara, Diogo

Date Submitted

04-Sep-2018

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

• [@ScholarOneNews](#) | • [System Requirements](#) | • [Privacy Statement](#) | • [Terms of Use](#)

• [Homee](#)

• [Autthorr](#)

04/09/2018 ScholarOne Manuscripts

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação on-line do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Committee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

Formatação do texto

▪ O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

▪ Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

▪ **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

▪ **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

▪ **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

▪ **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o *Keyword* (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto *keyword* (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

▪ **Introdução.** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

▪ **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

▪ **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

✓ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota:

✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

▪ **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

▪ **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

▪ **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

▪ **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

▪ A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

▪ **Citação de citação.** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

- *Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6a ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.