

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA  
(Patologia e Ciências Clínicas)**

**TESE**

**Produção *in vivo* e identificação do sexo de  
embriões híbridos *Equus caballus* x *Equus asinus***

**Paula Cardoso de Almeida Silva**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**  
**(Patologia e Ciências Clínicas)**

**PRODUÇÃO *IN VIVO* E IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES**  
**HÍBRIDOS *Equus caballus* X *Equus asinus***

**PAULA CARDOSO DE ALMEIDA SILVA**

*Sob a orientação do Professor*  
**Júlio Cesar Ferraz Jacob**

*e Co-orientação da Professora*  
**Denise Monnerat Nogueira**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Novembro de 2015

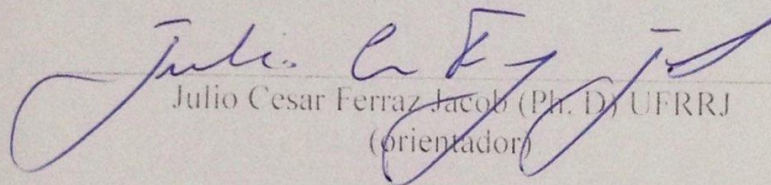
636.08  
9264                      Silva, Paula Cardoso de Almeida,  
S586p    1985-  
T                      Produção *in vivo* e  
                         identificação do sexo de embriões  
                         híbridos *Equus caballus* X *Equus asinus*  
                         / Paula Cardoso de Almeida Silva -  
                         2015.  
                         83 f.: il.  
  
                         Orientador: Júlio Cesar Ferraz  
                         Jacob.  
                         Tese                      (doutorado)                      -  
                         Universidade Federal Rural do Rio de  
                         Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
                         Medicina Veterinária.  
                         Bibliografia: f. 51-68.  
  
                         1. Embriologia veterinária -  
                         Teses. 2. Transferência de embriões -  
                         Teses. 3. Eqüino - Transferência de  
                         embriões - Teses. 4. Moléculas -  
                         Análise - Teses. I. Jacob, Júlio Cesar  
                         Ferraz, 1961-. II. Universidade  
                         Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso  
                         de Pós-Graduação em Medicina  
                         Veterinária. III. Título.

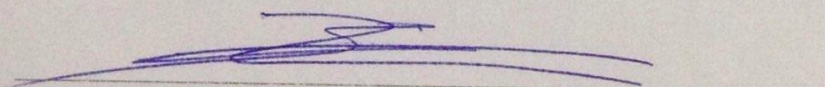
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

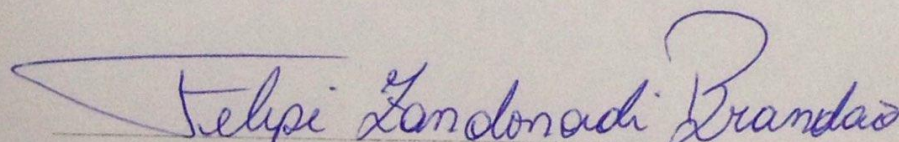
PAULA CARDOSO DE ALMEIDA SILVA

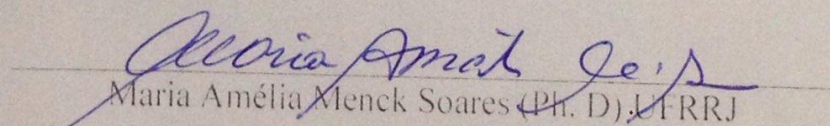
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

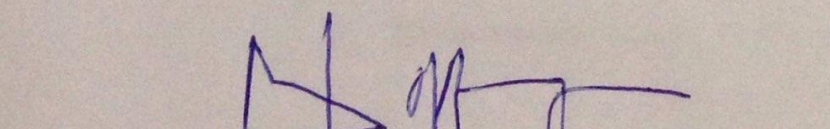
TESE APROVADA EM 06/11/2015

  
Julio Cesar Ferraz Jacob (Ph. D) UFRRJ  
(orientador)

  
Luciano Andrade Silva (Ph. D) USP

  
Felipe Zandonadi Brandão (Ph. D) UFF

  
Maria Amélia Menck Soares (Ph. D) UFRRJ

  
Marco Roberto Bourg de Mello (Ph. D) UFRRJ

*"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido,  
mas aquele que vai acompanhado  
com certeza vai mais longe."*

*CLARICE LISPECTOR*

*A minha mãe Thelma e meu pai Antonio,  
pelo apoio, amor e esforço, que sempre dedicaram*

*Aos familiares e amigos que fizeram  
acreditar que era possível*

*Aos animais*

*Inspiração profissional*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS provedor da vida, saúde, paz, equilíbrio e força nos momentos difíceis.

A minha mãe THELMA CARDOSO DE ALMEIDA que nunca deixou de me apoiar, que mesmo longe se fez presente em todas as minhas decisões e conquistas, e sem dúvida a pessoa que sempre acreditou e acredita que posso conquistar todos os meus sonhos.

Ao meu pai ANTONIO MACEDO DA SILVA, que sempre esteve por perto se preocupando com o caminho que estava trilhando, ele que sempre se mostrou um cara durão, até me surpreender com sua emoção diante das minhas conquistas.

A minha família, minhas avós ANA e ENEID, minhas tias ADRIANA, VIRGINIA, CRISTINA, ROSELY e REGINA, minha madrinha TIA MARLI, meus tios LUIS e WÁ (WAGNER), minha prima TATI, aos meus primos RAFA, FLÁVIO e PAULINHO, aos postigos TIO JÚ, NAJLA, MARCO, a minha “boadrasta” ANDREA e, ao meu querido VÔ DARCY, que não está mais entre nós, meu imenso agradecimento por todos vocês terem acreditado em mim e pela presença de vocês em minha vida.

A minha irmã MEL e meu irmão RODRIGO que tornam a minha vida mais feliz.

Ao meu namorado RAFAEL, pelo esforço para que ficássemos juntos, por suportar a distância, agüentar minha chatice, e confiar que por onde quer que eu vá, vamos estar juntos!

Aos meus amigos, estagiários, parceiros SÁVIO, RENATINHO, DIOGO, GABRIEL DUTRA, com os quais sempre pude trabalhar, contar, rir, reclamar e brigar...

Ao amigo JHONNATHA, pelo apoio, pelas tardes de conversa, pelas viagens trabalhando, e pelo apoio de sempre.

Aos estagiários e colegas do DRAA: BRUNA PATRÍCIA, KK, CÁSSIA, BRUNO, JADER, FLAVIA, ANANDA, MARCUS, DANI e aos estagiários das matrizes BRUNA e PHILIPPE, por todos os dias de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética, CAROL, JOANA, DIEGO, MONIQUE, LÉO, ADRIANA, pela paciência e solidariedade que sempre dedicaram.

Ao meu orientador professor JÚLIO CESAR FERRAZ JACOB, pela oportunidade, por seus ensinamentos, pela confiança depositada, e também pelos gritos, que hoje fazem parte do passado, mas que de alguma forma me fizeram crescer.

A minha querida Co-orientadora, DENISE MONNERAT que me recebeu de braços abertos, me passou seus conhecimentos de maneira calma e tranquila, me apoiou, torceu por mim, e com certeza foi à escolha mais certa para realização desse trabalho.

Aos professores MARCO MELLO, TRÉS e VERA, que sempre estiveram à disposição para me ajudar.

Aos demais amigos do DRAA, ao “pessoal” da parte de equinos e também ao “pessoal” da parte de bovinos, que promoviam momentos de descontração, e o ânimo necessário para seguir em frente.

A todos os funcionários e amigos do DRAA: ZICO (Orozimbo), ZEZINHO (José Xavier), MICUIM (Antonio), LUIZ e RENEU, das Matrizes: TATIANE, NORI, BETO e MINEIRO, dos ganhões: JORGINHO, CINTIA, VITOR e FOFINHO e da genética: FRANCISCO, muito obrigada pela ajuda sempre, com certeza não seria possível realizar esse trabalho sem a ajuda de todos vocês.

Às minhas amigas MIRIAM, ROBERTA, TALITA, DANI, LILIAN, GISELI, JAPA, e ao amigo CARLOS, vocês não estiveram ligados diretamente ao trabalho, mas com certeza estiveram ao meu lado pra que eu conseguisse concretizar mais esse sonho.

Aos outros amigos e também aos colegas, pelos momentos que fazem a vida ser mais leve e feliz.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (UFRRJ), bem como o corpo docente da Veterinária e da Zootecnia pelo aprendizado e apoio durante a realização deste trabalho.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

Aos animais, por fazerem a minha vida mais feliz, pelos ensinamentos ao mostrar tamanho carinho sem querer nada em troca, e por serem a parte principal do projeto experimental, sem eles o trabalho não teria sido realizado.

Peço desculpas caso não tenha citado algum nome, são tantas pessoas para agradecer que escreveria uma tese... por isso meu mais sincero obrigado à todos que fizeram parte do meu trabalho e da minha vida.

Muito obrigada!



## RESUMO

SILVA, Paula Cardoso de Almeida Silva. **Produção *in vivo* e identificação do sexo de embriões híbridos *Equus caballus* x *Equus asinus***. 2015. 84p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A transferência de embriões e outras biotecnologias reprodutivas são cada vez mais utilizadas para a produção de equinos e de outros animais, entretanto, mesmo com a expansão do mercado de muares e com crescimento do número de animais, as pesquisas relacionadas com a produção desses animais ainda são raras. O presente estudo avaliou as características relacionadas à transferência de embriões, a morfologia e a identificação do sexo de embriões híbridos (muares), verificando sua semelhança ou divergência com as características já conhecidas em equinos. Foram realizadas colheitas de embriões provenientes do cruzamento de éguas com um jumento Pêga, nos dias 6, 7, 8 e 9 após a ovulação, a taxa de recuperação embrionária, e as características relacionadas com a idade, morfologia e diâmetro embrionário foram avaliadas para os diferentes dias. Após essas avaliações, uma parte dos embriões coletados foi seccionada, com uma técnica adaptada onde o corte foi realizado com o auxílio de uma lâmina de bisturi oftalmológico. A maior porção resultante do corte foi destinada para transferência de embriões e a menor parte, juntamente com os embriões inteiros, foram utilizados para verificar a eficiência dos primers *SRY* e *ZFX/ZFY*, na análise molecular para a determinação do sexo dos embriões. Os dados foram analisados pelo teste Exato de Fisher, com 5% de significância, exceto o crescimento diário dos embriões que foi analisado através da regressão linear. A taxa de recuperação embrionária total foi de 55,9% (71/127), e para os diferentes dias de colheita D6, D7, D8 e D9, foi 57,1% (28/49), 51% (25/49), 63% (15/24), 60% (3/5), respectivamente. Os embriões coletados apresentavam-se nos seguintes estágios de desenvolvimento, mórulas: 18,3% (13/71); blastocistos iniciais: 26,8% (19/71); blastocistos: 29,6% (21/71); e blastocistos expandidos: 25,3% (18/71). O diâmetro mensurado revelou que o tamanho dos embriões variou entre 147 - 1688µm, a média do diâmetro de todos os embriões recolhidos foi de 438,04µm, e de acordo com os diferentes dias de colheita, o tamanho médio (maior e menor diâmetro) dos embriões foi de: D6 (n = 29) – 183,4µm (147 - 253µm), D7 (n = 24) – 463,2µm (168 - 886µm), D8 (n = 15) – 727,2µm (422 - 1224µm) e D9 (n = 3) – 1350,6µm (844 - 1688µm), e a taxa de crescimento diária foi de 312,7µm. Após a secção e transferência de 23 embriões, apenas uma receptora foi diagnosticada como gestante aos 15 dias, mas aos 30 dias, o embrião tinha sido absorvido. A identificação do sexo através da técnica de PCR, utilizando os primers *SRY* e *ZFx/ZFy* foi de 85,9% (61/71), sendo determinado fêmeas: 55,7% (34/61) e machos: 39,3% (27/61). A transferência de embriões é favorável para auxiliar na produção de muares, a taxa de recuperação e as características dos embriões são semelhantes aos embriões equinos. A metodologia de secção dos embriões, inviabilizou o desenvolvimento gestacional, entretanto a biopsia oriunda do corte permitiu a sexagem da maioria dos embriões coletados.

**Palavras-chave:** Transferência de embriões, sexagem embrionária, muares, análise molecular.

## ABSTRACT

SILVA, Paula Cardoso de Almeida Silva. ***In vivo* production and sex determination of hybrid embryos *Equus caballus* x *Equus asinus***. 2015. 84p. Thesis (Doctored in Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Embryo transfer and other biotechnologies are intensively used for equine reproduction and other species as well. Even though there is an expansion of the mule market and an increase in the number of animals, researches working with reproduction of these animals are still scarce. The aim of this study was to evaluate aspects of embryo transfer, embryo morphology and gender identification of hybrid (horses x donkeys) embryos, checking either their similarity or divergence with the characteristics already known of equine embryos. Attempts of embryo collection on Day 6 -9 after OV were performed in mares previously bred with a Pêga donkey. The embryo recovery rates, the characteristics related to age, morphology and embryonic diameter were evaluated. After these assessments, a group of embryos was cut using an adapted technique, where, the cutting process was carried out with the aid of an ophthalmic scalpel blade. The resulting biggest cut portion was used for embryo transfer, and the smallest parts and the others whole embryos to determination of the embryo gender. Data were analyzed using Fisher's exact test, with 5% significance, except the daily growth of embryos, which was analyzed by linear regression. The overall embryo recovery rate was 55,9% (71/127), and for each group D6, D7, D8 and D9, was 57,1% (28/49), 51% (25/49), 63% (15/24) 60% (3/5), respectively. The developmental stage of the collected embryos were, morula: 18.3% (13/71); early blastocysts: 26,8% (19/71); blastocyst: 29,6% (21/71); and expanded blastocysts: 25,3% (18/71). The measured diameter revealed that the size of the embryos ranged from 147 to 1688 $\mu$ m, the mean diameter of all collected embryos was 438,04 $\mu$ m, and according to different groups, the average size (smallest and largest diameter) of embryos were D6 (n = 29) - 183,4 $\mu$ m (147 - 253 $\mu$ m), D7 (n = 24) - 463,2 $\mu$ m (168 - 886 $\mu$ m), D8 (n = 15) - 727,2 $\mu$ m (422 - 1224 $\mu$ m) and D9 (n = 3) - 1350,6 $\mu$ m (844 - 1688 $\mu$ m), and daily growth rate was 312,7 $\mu$ m. After the section, the 23 embryos were transferred, only one recipient mare was diagnosed as pregnant at 15 days after ovulation, however after 30 days the embryo was lost. The efficiency of the sex identification by PCR using the primers *SRY* and *ZFX / ZFY* was 85,9% (61/71), being 55,7% (34/61) determined as female: and 39,3% (27/61) as male. Embryo transfer has shown to be favorable to aid mule reproduction, whereas the recovery rate and the characteristics of the embryos are similar to equine embryos. Although, the methodology used to section of embryos had unable the gestational development, the most part of the biopsy derived cutting allowed sexing of the embryos.

**Keywords:** Embryo transfer, embryo sexing, mules, molecular analysis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Mula pertencente ao DRAA (arquivo pessoal); (B) Burro pertencente ao DRAA (arquivo pessoal); (C) Bardoto (retirado de: Oliveira et al., 2004). 03
- Figura 2.** Estágios embrionários: Embrião equino (Grau I) no estágio de mórula (A); Embrião equino (Grau I) no estágio de blastocisto inicial (B); Embrião equino (Grau I) no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível (C); Embrião equino (Grau I) no estágio de blastocisto expandido (D); Par de ovócitos não fertilizado (E). 17
- Figura 3.** Visualização do sistema de retículo micrométrico utilizado para mensuração dos embriões (A); Zoom utilizado como padrão para mensurar o tamanho dos embriões (B). 32
- Figura 4.** Lâmina de bisturi oftalmológico utilizada para seccionar os embriões (A); Detalhe lâmina de bisturi oftalmológico (B). 33
- Figura 5.** Esquema de posicionamento e corte do embrião (A); Duas porções do embrião híbrido após o corte, onde a menor foi utilizada para a identificação do sexo e a maior parte para a transferência para o útero das éguas receptoras (B). 34
- Figura 6.** Mórula de 169 $\mu$ m de diâmetro antes do corte (A) e depois do corte (B). 44
- Figura 7.** Blastocisto expandido de 1688 $\mu$ m de diâmetro antes do corte (A) e depois do corte (B). 44
- Figura 8.** Identificação do sexo dos embriões híbridos de equinos e asininos, por PCR heterodúplex para os genes SRY e ZFX/ZFY, em gel de poliacrilamida a 5% corado por solução de nitrato de prata a 0,2%. (L) DNA Ladder de 50pb; Amostras identificadas como macho (M), presença de duas bandas, correspondentes aos fragmentos dos genes zfx/zfy (445pb) e SRY (217pb) ligados aos cromossomos X e Y. Amostras identificadas como fêmeas (F), com presença de apenas uma banda correspondente ao gene ZFX (445pb) ligado ao cromossomo X. Controle positivo de fêmea (F+), Controle positivo macho (M+), Controle negativo (N). 47

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Estágio de desenvolvimento do embrião equino.	17
<b>Quadro 2.</b>	Sistema de quatro pontos para classificação de embriões equinos em relação a qualidade	18
<b>Quadro 3.</b>	Características relacionadas à categoria, raça, número de animais e idade das éguas utilizadas no experimento.	30
<b>Quadro 4.</b>	Sequência dos <i>primers</i> e tamanho esperado dos fragmentos amplificados para a identificação do sexo dos embriões	35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de ciclos, média e desvio padrão do tamanho do folículo no momento do tratamento, e percentual de éguas ovuladas com os diferentes agentes indutores da ovulação 37
- Tabela 2.** Características dos embriões seccionados e transferidos para as éguas receptoras. 44
- Tabela 3.** Identificação do sexo dos embriões inteiros e seccionados, de acordo com a idade, o estágio e o tamanho dos embriões. 48

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b>	Taxa de recuperação embrionária nos diferentes dias de colheita de embriões híbridos.	38
<b>Gráfico 2.</b>	Taxa de recuperação embrionária em D6, D7 e D8, para as diferentes raças das doadoras.	39
<b>Gráfico 3.</b>	Embriões híbridos recuperados no D6, D7, D8 e D9, e seus respectivos estágios de desenvolvimento	40
<b>Gráfico 4.</b>	Diâmetro dos embriões coletados nos diferentes dias após a ovulação.	41
<b>Gráfico 5.</b>	Taxa de crescimento diária dos embriões híbridos	42
<b>Gráfico 6.</b>	Tamanho dos embriões híbridos em diferentes estágios de desenvolvimento	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRAA	Departamento de Reprodução e Avaliação Animal
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
eLH	Hormônio Luteinizante Equino
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
PGF	Prostagandina
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PGE2	Prostaglandina E2
EPE	Extrato de Pituitária equina
CL	Corpo Lúteo
IA	Inseminação Artificial
TE	Transferência de Embrião
Mo	Mórula
Bi	Blastocisto Inicial
B1	Blastocisto
Bx	Blastocisto Expandido
UFO	Ovócito não fertilizado
$\mu$ m	Micromêtro
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ g	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
$\mu$ M	Micromolar
ng	nanograma
$\mu$ g	Micrograma
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
UI	Unidades internacionais

h	Horas
n	Número de unidades experimentais
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
p	Valor de p
sptz	Espermatozóides
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FDT	Fator Determinante Testicular
SRY	<i>Sex determining region of the Y chromosome</i>
ZFX	<i>Zinc Finger Protein X-Linked</i>
ZFY	<i>Zinc Finger Protein Y-Linked</i>
FISH	Fluorescent in Situ Hybridization
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
cDNA	DNA complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
MgCl <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Cloreto de Magnésio
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Prata
NaOH	Hidróxido de Sódio
AMEL	Amelogenina
pb	Pares de bases
MHz	Mega-hertz
TE <sub>m</sub>	Tamanho do embrião que deseja determinar
NDC	Número de divisões
AO	Amplificação da objetiva
ASZ	Amplificação do sistema de zoom
PEP	Perda embrionária precoce



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
/	Por (1/100)
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual
X	Versus
x	vezes
-	Menos/negativo
+	Mais
°	Grau
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1	Os Muares .....	3
2.2	Transferência de Embrião (TE).....	5
2.3	Fatores que Influenciam a Recuperação Embrionária.....	6
2.3.1	Doadora .....	6
2.3.2	Controle do ciclo estral.....	7
2.3.2.1	Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).....	9
2.3.2.2	Deslorelina, análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH).....	10
2.3.3	Qualidade do sêmen.....	10
2.3.4	Dia da colheita .....	11
2.3.5	Técnica de colheita de embriões .....	12
2.3.6	Formação e morfologia embrionária .....	14
2.3.7	Avaliação embrionária.....	16
2.4	Mobilidade Embrionária e Reconhecimento Materno .....	19
2.5	Fatores que Afetam a Taxa de Gestação .....	19
2.5.1	Seleção de receptoras.....	19
2.5.2	Escolha da receptora no dia da TE.....	20
2.5.3	Método de transferência .....	22
2.6	Sexagem de Embriões .....	23
2.6.1	Micromanipulação embrionária .....	25
2.6.2	Análise do DNA .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	Período e Local de Execução.....	30
3.2	Transferência de Embriões (TE) .....	30
3.2.1	Animais.....	30
3.2.2	Controle do ciclo estral.....	31
3.2.3	Inseminação artificial (IA).....	31
3.2.4	Colheita dos embriões .....	31
3.2.5	Avaliação dos embriões.....	32
3.2.6	Preparação dos embriões para identificação do sexo .....	33
3.2.7	Transferência dos embriões seccionados .....	34
3.3	Análise Molecular .....	<b>35</b>
3.3.1	Extração do DNA.....	35
3.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	35
3.3.3	Identificação dos produtos da PCR.....	35
3.4	Análise Estatística .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os muares foram utilizados desde a época do Brasil Império. Sobre o lombo desses animais era feito o transporte de alimentos, mercadorias, armas, munições e o transporte de riquezas como: o ouro, o açúcar dos engenhos e o café das fazendas. São animais de grande popularidade no meio rural e urbano, especialmente em virtude da sua rusticidade, força física, docilidade, e pela capacidade de realizar serviços em regiões com topografia acidentada, além da adaptação aos mais variados climas do Brasil.

Antigamente, os muares eram considerados animais de “carga”, com grande aptidão para o serviço, sendo utilizados na lida diária das fazendas. Entretanto, com o passar dos anos, esses animais deixaram de ser utilizados como animais de “carga” e passaram a ser animais de grande importância, crescendo o número de mulas e burros selecionados a partir do cruzamento de éguas e jumentos de alto valor zootécnico. Os muares provenientes desse cruzamento são animais valorizados, caracterizados pelos criadores como animais completos, que apresentam qualidade, funcionalidade e beleza zootécnica. Os criadores de muares são apaixonados por esses animais, e promovem grandes encontros, chamados “encontros de muladeiros”, além das exposições, provas, concursos, cavalgadas e romarias, que a cada dia contam com um número maior de animais de alto valor zootécnico e atingem um público nunca antes imaginado.

Em equinos a Transferência de embrião (TE), é a técnica de reprodução assistida mais efetiva para obter um maior número de descendentes de animais geneticamente superiores, e dessa forma poderia auxiliar na produção do número de muares. A TE também possibilita a avaliação de características morfológicas e identificação do sexo dos embriões coletados. O conhecimento do sexo dos embriões produzidos em programas de TE permite uniformizar o plantel, ou seja, pode ser feita apenas a transferência dos embriões do sexo feminino, no caso as mulas, e assim criar um plantel somente de mulas que apesar de inférteis podem ser utilizadas como receptoras de embrião.

Apesar da expansão do número, das atividades realizadas e da valorização desses animais, o uso de biotécnicas da reprodução e o desenvolvimento de pesquisas científicas para a produção de muares ainda é escasso. Não existem relatos sobre a TE para a produção de muares e identificação do sexo de embriões híbridos. Em geral, as mulas e burros são tratados com base no que se conhece a respeito de equinos e asininos, sem levar em consideração possíveis divergências em relação as características fisiológicas, metabólicas, reprodutivas e etc, uma vez que essas podem ser diferentes das características conhecidas dos seus progenitores.

Diante desse contexto, torna-se importante avaliar distintivamente embriões de equinos e embriões híbridos (muares), verificando se os embriões híbridos (*Equus caballus* x *Equus asinus*) podem ser recuperados entre os dias 6 e 9 pós-ovulação, e se os mesmos apresentam diferenças em relação à morfologia já conhecida dos embriões equinos. Além disso, a empregabilidade de técnicas que aumentem o número de embriões muares torna possível a aplicação de outras biotecnologias como, a sexagem embrionária, e neste caso é importante verificar a possibilidade de realizar a extração de células embrionárias sem utilizar um equipamento de micromanipulação, e se o material extraído dos embriões entre 6 a 9 dias permite a identificação do sexo através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando primer para equinos, sem prejudicar o desenvolvimento do embrião e consequentemente as taxas de gestação.

O presente estudo avaliou a taxa de recuperação embrionária, e as características morfológicas de embriões de éguas x jumentos, em comparação a morfologia de embriões equinos. Além de avaliar o emprego de uma técnica de baixo custo para realizar a extração de

células embrionárias destinadas a identificação do sexo através do uso da técnica de PCR, verificando sua influencia na viabilidade dos embriões manipulados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os Muares

Não existem registros oficiais e não há como determinar quando ocorreu o primeiro cruzamento de um jumento com uma égua, ou do cavalo com a jumenta. Pesquisas sugerem que pode ter acontecido na Índia, Pérsia, Somália, Tibet, Núbia, Ásia menor, pois nessas regiões surgiram os primeiros jumentos e cavalos (OLIVEIRA, 2004).

Os primeiros jumentos foram trazidos para o Brasil no período do descobrimento, e nessa mesma ocasião também ocorreu à chegada dos muares no país. Segundo os historiadores, quando D. Pedro proclamou o grito de independência, nas margens do rio Ipiranga, ele não estava montado em um cavalo, e sim em uma mula de pelagem baixa. Estes animais foram indispensáveis para vencer os contrastes topográficos na época da ocupação e desenvolvimento territorial (OLIVEIRA et al., 2007).

Em todo o mundo existem cerca de 44 milhões de muares, 96% destes, encontra-se em países em desenvolvimento e contribuem significativamente para a economia rural (THEIMANN; BELL, 2001). O Brasil conta hoje com 1,3 milhão de muares, do total de 8 milhões de eqüídeos, esses números são completados por 5,5 milhões de equinos e pouco mais de 1 milhão de asininos (IBGE, 2010). Dados da FAO (*Food and agriculture organization of the United Nations*) de 2011 revelam que o Brasil tem a terceira maior população de muares do mundo, ficando atrás apenas do México e da China.

Os muares são os híbridos mais conhecidos (WODSEDALEK, 1916) e mais utilizados no mundo (GASTAL et al., 2014). São animais oriundos do cruzamento entre *Equus asinus* - asininos (jumento e jumenta) com equinos - *Equus caballus* (égua e garanhão). Quando os muares são os produtos do acasalamento entre o jumento e a égua, recebem o nome de mula – a fêmea (Figura 1A) ou burro – o macho (Figura 1B) e quando o acasalamento ocorre entre o cavalo e a jumenta, os produtos recebem o nome de bardoto, seja fêmea ou macho (Figura 1C) (OLIVEIRA et al., 2007).

O bardoto assemelha-se morfologicamente mais ao cavalo que ao jumento, pelo menor tamanho das orelhas, maior abundância de crinas e conformação do posterior, guardando, no entanto, as mesmas características comportamentais da mula. Portanto, o bardoto teria um esqueleto semelhante aos asininos e uma fisionomia mais parecida com os equinos, já o burro e a mula, apresentam as características inversas (OLIVEIRA, 2004).



**Figura 1.** (A) Mula pertencente ao DRAA (arquivo pessoal); (B) Burro pertencente ao DRAA (arquivo pessoal); (C) Bardoto (retirado de: Oliveira et al., 2004).

Diferentes espécies do gênero *Equus*, podem se intercruzar, produzindo descendentes viáveis, porém, inférteis, como as mulas, burros e bardotos, esses híbridos expressão

claramente ambos os fenótipos de seus ascendentes, e dessa forma, contribuem para a compreensão do mecanismo de herança (ALLEN; SHORT, 1997).

A primeira explicação da esterilidade dos muares foi reportada por Wodsedalek (1916), que sugeriu que os burros não produziam espermatozoides em função de um bloqueio na meiose devido à incompatibilidade dos cromossomos maternos e paternos. Mais tarde, essa teoria foi apoiada quando através de avaliações citológicas, demonstrou-se que os asininos possuem 62 cromossomos, dos quais 38 são metacêntricos, enquanto os equinos possuem 64 cromossomos com 26 metacêntricos, e dessa maneira o produto gerado por esse cruzamento apresenta 63 cromossomos com muitos pares combinados de forma desigual (HSU; BENIRSCHKE, 1968).

O bloqueio da meiose relatado nos machos muares também acontece nas mulas, durante o período fetal, as células germinativas migram normalmente para as gônadas do feto híbrido, e as divisões mitóticas acontecem normalmente, porém após o nascimento a maioria das células germinativas não entra na meiose e acaba degenerando. Apenas um pequeno número de células consegue passar pela meiose e se desenvolver em oócitos, que são capazes de sobreviver até a ovulação, e possivelmente esse é o fator que permite que algumas mulas sejam férteis, entretanto, o mecanismo pelo qual apenas algumas células conseguem passar pela meiose e se desenvolver, ainda não foi elucidado (TAYLOR; SHORT, 1973).

Desde o início do século, uma série de relatos demonstra a existência de mulas férteis, um dos mais notáveis ocorreu na Texas A & M College em 1920, onde uma mula deu à luz a dois potros. Um dos produtos foi proveniente do cruzamento da mula com um jumento, e nesse caso, o potro tinha a aparência de mula e era infértil, o outro, gerado pelo cruzamento da mula com o cavalo, gerou um potro completamente igual ao cavalo na aparência e que era totalmente fértil (ANDERSON, 1939).

Uma explicação para o ocorrido no Texas foi reportado por Chandley (1988) que sugeriu com base na hipótese da afinidade, proposta originalmente por Michie (1953) que os gametas haplóides balanceados podem ocasionalmente serem produzidos pelo movimento dos centrômeros de ancestralidade similar, para os pólos opostos na anáfase I da meiose. Isso faria com que todo um conjunto de cromossomos parentais da fêmea de uma das espécies permanecesse no oócito, com subsequente eliminação do conjunto paterno no corpúsculo polar. A eliminação do conjunto de cromossomos paterno (jumento) deixaria no oócito da mula apenas o conjunto de cromossomos materno (égua), portanto, se essa mular fosse casada com um jumento, daria origem a um novo muar (mula ou burro), e se fosse acasalada com um garanhão, originaria um novo equino (égua ou cavalo). No entanto, mais tarde o autor reportou que após a cariotipagem de uma mula fértil, foi encontrada uma mistura de cromossomos do cavalo e jumento, sugerindo uma herança ao acaso de ambos os cromossomos maternos e paternos no oócito fecundado.

Segundo Zong e Fan (1989), a esterilidade dos muares não é absoluta, esses autores demonstraram que a esterilidade dos muares varia em sua manifestação e no grau que ocorre entre os indivíduos, eles verificaram que algumas mulas apresentavam estros outras não; algumas possuíam ciclos irregulares, e outras, ciclos regulares; algumas fêmeas demonstravam cio, sem a presença de folículos desenvolvidos, enquanto outras, os folículos se desenvolveram e chegaram a ovular. Segundo esses autores as mulas e bardotas que apresentam ciclos estrais e características de ovulação, podem ser cruzadas com cavalos ou jumentos, algumas vezes após inúmeras tentativas não ocorre a gestação, em outros casos são identificadas como gestantes, mas, acabam por abortar, e ainda aquelas que conseguem gestar e parir, podem não repetir o feito por diversos anos, ou podem ficar gestantes frequentemente.

Muito pouco do que se conhece a respeito dos muares é oriundo da pesquisa científica, isso porque as mulas e burros variam muito na sua composição genética, e deixam de ser bons

temas para a pesquisa, conseqüentemente o que se sabe sobre muare geralmente é baseado no conhecimento de equinos e asininos (BURNHAM, 2002).

## 2.2 Transferência de Embrião (TE)

A transferência de embrião é uma técnica que consiste na colheita do embrião de uma égua doadora e sua transferência para o aparelho reprodutivo de uma égua receptora, previamente sincronizada com a égua doadora (BLANCHARD et al., 2003). É uma biotécnica baseada no princípio da multiplicação da progênie de fêmeas consideradas superiores dentro de um rebanho (BORTOT; ZAPPA, 2013).

A TE é a ferramenta mais promissora para acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos, sendo cada vez mais comum seu uso para a obtenção de produtos (LIRA et al., 2009), além de permitir a preservação de espécies que estão desaparecendo devido à caça predatória ou ao cruzamento indiscriminado com outras raças (FARINASSO et al., 1989). Essa biotécnica tem sido utilizada para a produção de múltiplos potros por égua durante o ano (LIRA et al., 2009). Outras vantagens da TE são: (1) obtenção de potros de éguas com problemas reprodutivos ou mais velhas; (2) aumento da produção de éguas geneticamente superiores; (3) produção de potros descendentes de éguas que encontram-se em performance, sem necessidade de parar as atividades devido a gestação e/ou lactação; (4) obter produtos de potras com 2 anos sem alterar seu desenvolvimento (CARNEIRO, 2005); (5) permite também o uso de éguas com doenças sistêmicas ou musculoesqueléticas que impossibilitam a gestação ou colocam em risco a vida da égua; (6) não coloca em risco a vida de éguas valiosas devido as complicações no pós-parto; (7) pode ser combinada com novas tecnologias da reprodução como: uso de sêmen congelado, técnicas de inseminação com baixa dose de sêmen, transferência de oócitos, injeção intracitoplasmática de gametas e a sexagem de embriões (McKINNON; SQUIRES, 2007).

Os primeiros estudos de TE em equinos, foram realizados por Oguri e Tsutsumi, nos anos de 1969 e 1970, obtendo uma taxa de recuperação embrionária de 45% (27 embriões de 60 colheitas). Essas colheitas foram realizadas entre seis e 10 dias após a ovulação. Dos embriões coletados, 11 foram transferidos pelo método não cirúrgico para o útero de receptoras que ovularam no mesmo dia das doadoras, porém, nenhuma gestação foi confirmada (OGURI; TSUTSUMI, 1972). Mais tarde, em 1974, os mesmos autores tiveram sucesso com a TE não cirúrgica, e obtiveram 40% de taxa de gestação. Nesse estudo 18 embriões foram coletados de 20 éguas doadoras, e 15 destes foram transferidos de forma não cirúrgica para as éguas receptoras com grau de sincronia -5 a +7 (ovuladas 5 dias antes até 7 dias após as doadoras), resultando em seis gestações (40%) das quais quatro (26,7%) chegaram a termo (OGURI; TSUTSUMI, 1974).

No Brasil, a primeira TE em equinos foi descrita por Fleury e colaboradores (1987), mas somente mais tarde foi disseminada, sendo hoje a técnica de reprodução em equinos mais difundida e em estágio avançado nas pesquisas (SQUIRES et al., 2003). O crescimento médio do número de embriões produzidos no Brasil tem sido de 20% ao ano, nos últimos cinco anos (ALVARENGA, 2010). Segundo o levantamento de 2010 da IETS (*International Embryo Transfer Society*) o Brasil passou a ocupar o primeiro lugar na produção de embriões, recuperando mais de 14 mil embriões, o que representa cerca de 43% da atividade mundial (STROUD; CALLESEN, 2012).

São poucos os estudos de TE envolvendo asininos, e normalmente visam à multiplicação de algumas raças em perigo de extinção (PANZANI et al., 2012). Quando relatamos o uso da TE envolvendo os muare, o foco é basicamente o uso das mulas como receptoras de embriões (QUINTERO et al., 1996; CAMILLO et al., 2003; 2010). Alguns grupos de pesquisa realizaram trabalhos com muare nas fazendas e criações, entretanto publicações científicas envolvendo esses animais referem-se sempre ao uso das mulas como

receptoras de embriões híbridos de jumentos e éguas, mas não apresentam informações detalhadas a respeito da recuperação desses embriões (RIBEIRO; MELLO, 2006).

A literatura é escassa no que diz respeito à eficiência reprodutiva das éguas envolvidas na produção de muares (GONCZAROWSKA, 2011), entretanto estudos utilizando a TE entre equinos e asininos mostraram dramáticas diferenças no tamanho, produtividade e vida útil dos cálices endometriais de éguas portadoras de embriões intraespécies (equinos) e embriões interespécies (híbridos – égua X jumento), contra jumentas gestantes de embriões intraespécies (asininos) e embriões bardotos (jumenta X cavalo) (ALLEN, 1975). Uma cinta coriônica larga, densa e ativa se desenvolve nas gestações intraespécies na égua e nas interespécies na jumenta, sendo que ambas tem o cavalo como progenitor, e isso dá origem à cálices endometriais grandes e ativos, que secretam altas concentrações de gonadotrofina coriônica equina (eCG) na corrente sanguínea materna, com persistência da atividade gonadotrófica até os 120 – 140 dias de gestação. Por outro lado uma cinta coriônica muito mais fina e estreita com menor produção de eCG pelos cálices endometriais, acontece nas gestações intraespécies de jumentas e nas éguas gestantes de embriões muares, onde o jumento é o progenitor nas duas gestações (ALLEN; MOOR, 1972; ALLEN, 1975).

A TE é uma técnica de baixa complexidade quando comparada com outras técnicas mais avançadas (HINRICH; CHOI, 2005), entretanto, torna possível a criação de diversos modelos experimentais únicos e fascinantes que, permitem revelar uma influência muito maior dos progenitores e dos conceptos, que até agora sequer tinha sido imaginado (ALLEN; SHORT, 1997). O sucesso desta técnica depende de múltiplos fatores, incluindo a fertilidade das éguas doadoras e receptoras, fertilidade do sêmen, e a experiência do médico veterinário (METCALF, 2004).

### **2.3 Fatores que Influenciam a Recuperação Embrionária**

A taxa de recuperação embrionária a partir das éguas doadoras é que vai determinar o sucesso de um programa de TE (SQUIRES et al., 1999). Em geral a taxa de recuperação embrionária em equinos está em torno de 60 – 70% (CARVALHO et al., 2001; JACOB et al., 2002, CARMO, 2003; GOMES et al., 2004; FILHO, 2005; MOZZAQUATRO, 2008), em asininos os índices ficam em torno de 53 – 67% (ALLEN et al., 1985; VENDRAMINI et al., 1997). Pesquisas mais recentes (KUMAR et al., 2008; MORTENSEN et al., 2009; RAZ et al., 2009; GORETTI et al., 2011), reportam avanços nos índices de recuperação embrionária em equinos com taxas de 81%, 73%, 63% e 80%, respectivamente.

Em 1996, Quintero e colaboradores inseminando éguas com sêmen de jumentos, coletaram dois óvulos não fertilizados e dois blastocistos expandidos, sem relatar, no entanto, quantas colheitas foram necessárias para obter os embriões. Ribeiro e Mello (2006) também coletaram sete embriões provenientes do cruzamento de éguas com jumentos, que foram transferidos para o útero de mulas acíclicas, entretanto, os autores não descreveram o número de lavados necessários para obtenção desses embriões.

Múltiplos fatores afetam a taxa de recuperação embrionária como: características da doadora (condição uterina, idade), dia da colheita do embrião, número de ovulações (ALONSO, M.A., 2008), manejo reprodutivo (controle de desenvolvimento folicular, ovulação), nutrição, sanidade, tipo e qualidade do sêmen, habilidade do técnico, além de fatores como as variações climáticas e adaptação da doadora na central de reprodução (GOMES; GOMES, 2008).

#### **2.3.1 Doadora**

A seleção da égua doadora para TE depende de vários fatores, como: idade da égua, histórico reprodutivo, conformação da vulva, valor genético, condição do útero, éguas



subférteis, diretrizes do registro da raça e o número de gestações (SQUIRES et al., 1999; COSTA, 2010).

Em equinos é comum o uso de animais idosos tanto matrizes quanto reprodutores. Em nenhuma outra espécie de animais de produção existe um percentual tão elevado de animais idosos. O interesse pela continuidade do uso destes animais se prende ao fato do lento melhoramento genético observado em equinos pela pequena quantidade de descendentes produzidos anualmente (ALVARENGA, 2010). A égua permanece em atividade reprodutiva por um maior período de sua vida, sendo frequente encontrar uma grande parte do contingente de doadoras de embriões, com mais de 20 anos de idade, quando se tratam de éguas de qualidade genética superior previamente comprovada na reprodução pela progênie apresentada (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

A TE é um procedimento que exige alto investimento, por isso sua utilização é normalmente restrita a éguas de alto valor zootécnico considerando que estas características sejam altamente herdáveis (RIERA, 2009).

Na produção de muaras a escolha da égua é feita levando em consideração a característica desejada para a produção das mulas e burros. Para a produção de um burro de tração (superburro), normalmente são escolhidas éguas da raça Bretão Postier, para uma mula marchadeira as éguas escolhidas são da raça Mangalarga Marchador ou Campolina, e nesses casos muitas vezes as outras características em relação à escolha da doadora são deixadas de lado (OLIVEIRA, 2004).

A candidata ideal como égua doadora de um programa de TE, é uma égua com três a dez anos, saudável e em boa condição reprodutiva (METCALF, 2004). Caso não haja histórico reprodutivo da doadora, deve-se realizar um exame reprodutivo completo da égua, sendo ideal a avaliação de um ou dois ciclos estrais de cada doadora antes da sua utilização no programa (RIERA, 2009). Caso sejam identificadas anormalidades reprodutivas, estas necessitam de tratamento, antes do início dos trabalhos com TE (VANDERWALL, 2000).

### **2.3.2 Controle do ciclo estral**

As éguas são consideradas poliéstricas estacionais, ou seja, têm ciclo reprodutivo dividido em período de competência sexual (estação reprodutiva) durante a primavera/verão e de incompetência reprodutiva (estação não reprodutiva) no outono/inverno (FARIA; GRADELA, 2010). A atividade sexual é determinada pelo fotoperíodo (relação luz/escuro), associado aos fatores ambientais e nutricionais (FITZGERALD; McMANUS, 2000).

O início da fase de atividade reprodutiva ocorre quando acontece a primeira ovulação do ano. O ciclo estral compreende o intervalo que vai de uma ovulação a outra, a duração de um ciclo estral equino varia de 19 a 22 dias (GINTHER, 1992). Pode ser dividido em duas fases: estro e diestro (SAMPER, 2008).

O estro, também conhecido como fase folicular (HUGHES et al., 1975; BLANCHARD et al., 1998) ou estrogênica tem a duração média de cinco - sete dias, mas pode variar bastante entre éguas e é caracterizado pelo relaxamento do útero e cérvix, presença de um folículo dominante de 30mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa, tornando a fêmea receptiva ao macho além da formação do edema uterino (SAMPER, 2008). A melhor maneira de detectar o cio é a presença do garanhão, onde a maioria das éguas, além de permanecer voluntariamente junto a este também permite a aproximação e cobrição (KNOTTENBELT et al., 2003).

Vinte e quatro a 48 horas antes do final do estro, ocorre a ovulação, que corresponde ao dia zero do ciclo estral (MOREL, 2003). Ao final do estro inicia-se o diestro (fase lútea ou progesterônica) que dura de 14 a 15 dias (DAELS; HUGHES, 1993). Nesta fase a égua apresenta uma ativa resistência ao garanhão, no ovário é formado o corpo lúteo com maior

secreção de progesterona (HUGHES et al., 1972, ALLEN, 1977, ROOSDALE; RICKETTS, 1980, DAELS; HUGHES, 1993) e a cérvix apresenta-se fechada e não se verifica edema endometrial (SAMPER, 2008). Durante essa fase, o ambiente uterino possui condições adequadas ao desenvolvimento embrionário (MALINOWSKY, 2002).

Se não houver fecundação, a fase lútea termina 14 a 15 dias após a ovulação, com regressão do corpo lúteo (CL) pela ação da prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) sintetizada pelo endométrio, e tem início um novo estro. Caso ocorra a fecundação, o embrião chega ao útero por volta do sexto dia após a ovulação, onde migrará com intuito de sinalizar a sua presença evitando que ocorra a luteólise do corpo lúteo (ALLEN; WILSHER, 2009). A regressão do CL só vai ocorrer ao redor dos 120 dias de gestação, quando a placenta vai ser responsável pela produção de progesterona (DAELS; HUGHES, 1993, MALINOWSKY, 2002).

Várias combinações de hormônios reprodutivos tais como prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (PGF e análogos), gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH e análogos) são utilizados no controle do desenvolvimento folicular, indução do tempo de ovulação, ciclo estral, período pós parto e durante a transição da primavera em éguas (PINTO; MEYERS, 2007).

O controle eficiente do ciclo estral é fundamental para atingir bons resultados com o uso da TE (GOMES; GOMES, 2008). Para tanto, deve ser realizado o monitoramento do comportamento reprodutivo, utilizando-se da palpação transretal e ultrassonografia para monitorar a atividade folicular e ter melhor controle do momento da ovulação, além do uso de hormônios exógenos no momento ideal para sincronizar o estro e a ovulação (VANDERWALL; WOODS, 2007).

A aplicação adequada da terapia hormonal na reprodução equina é de grande importância, pois permite o aumento do lucro através da melhora da eficiência reprodutiva, gerando benefícios tanto para o profissional quanto para o proprietário (FARIA; GRADELA, 2010). Dois procedimentos são comuns no manejo das éguas: um envolve a indução da luteólise e o outro a indução da ovulação (SAMPER, 2008).

A prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) está entre os hormônios mais utilizados na reprodução equina, é amplamente utilizada para controlar a lise do corpo lúteo (CL) em éguas cíclicas e também como suporte no uso das biotécnicas da reprodução (FARIA; GRADELA, 2010). Pode ser administrada para encerrar uma fase luteal, sincronizar o estro, tratar éguas com endometrite (McKINNON; VOSS, 1993), estimular a contração uterina, induzir o parto (OUSEY et al., 1984) e promover abortos antes da formação dos cálices endometriais (NEELY, 1983; McKINNON; VOSS, 1993). Atua também no transporte espermático, na motilidade das trompas e na contração do canal deferente (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em geral, após a aplicação da  $PGF_{2\alpha}$ , as éguas retornam ao cio entre três a cinco dias e acabam por ovular em sete a 12 dias (NEELY, 1983).

Como as éguas apresentam um tempo muito variável na duração do estro e no intervalo da ovulação, a utilização de fármacos indutores da ovulação é uma ferramenta importante no manejo reprodutivo (BEREZOWSKI et al., 2004). A indução da ovulação é constantemente utilizada nos casos de ganhões muito requisitados, quando o número de doses de sêmen disponível é limitada, ou se uma única inseminação é desejada, como em casos de éguas susceptíveis a endometrites (McCUE et al., 2007). Além disso, permite planejar o transporte da égua, no caso da cobertura ser no local onde está o ganhão, além de reduzir os custos com veterinário (SAMPER, 2008), melhora as taxas de gestação ao utilizar sêmen resfriado, congelado ou de baixa qualidade, próximo do momento da ovulação (SAMPER et al., 2002). Também pode ser benéfica em inseminações com baixa dose na extremidade do corno (KOLLING; ALLEN, 2005) e também para a sincronização da ovulação entre doadoras e receptoras de embrião (McCUE et al., 2007).

O momento adequado para a realização da prática da indução da ovulação consiste na utilização dos agentes indutores quando a égua apresenta um folículo  $\geq 35\text{mm}$  associado ao edema endometrial (PALMER, 1993). Após a indução da ovulação, a maioria das éguas irá ovular em um período entre 36 e 48 horas após a indução, demonstrando uma variação individual acentuada, a qual pode estar relacionada ao diâmetro folicular que cada égua ovula (SAMPER, 1997).

Os fármacos usualmente empregados para a indução de ovulação na espécie equina são o hCG e sintéticos de GnRH, como a deslorelina (BOAKARI, 2014), sendo também utilizado o extrato de pituitária equina (EPE) e o hormônio luteinizante equino (eLH) (CHAVATTE; PALMER, 1998).

### **2.3.2.1 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**

A Gonadotrofina Coriônica Humana foi o primeiro hormônio utilizado como indutor da ovulação em éguas (DAY, 1939). A hCG é um hormônio proteico com atividade de LH e que a ovulação ocorre aproximadamente 36 horas após o tratamento, mas a sua eficácia é afetada pela fase do ciclo estral, o tamanho e maturidade folicular (SAMPER, 2008). Anos mais tarde Ginther e colaboradores (2009), demonstraram que a hCG não possui atividade de LH, e dessa maneira não é responsável diretamente pela ovulação, a hCG está relacionada com o aumento do LH e este sim é o responsável pela ovulação, da mesma maneira que ocorre nas ovulações espontâneas.

A utilização da hCG na indução da ovulação, reduz o número de inseminações e de coberturas/ciclo (BERGFELT, 2000; VERONESI et al., 2003), incrementa os índices de fertilidade promovendo a sincronização do estro e a ovulação e aumenta as concentrações plasmáticas de progesterona e as taxas de prenhez (OLIVERIA; SOUZA, 2003). A utilização da hCG em receptoras de embrião, aumenta as concentrações plasmáticas de progesterona, melhora o tônus uterino e cervical, aumenta a morfoecogenicidade uterina e luteal, e o diâmetro do corpo lúteo, sendo essas características reprodutivas desejáveis para a transferência de embriões (SOUZA, 2006; FLEURY et al., 2007)

Alguns fatores devem ser levados em consideração no momento da aplicação da hCG, dentre eles: período do ano, comportamento de estro, ecotextura uterina, tônus uterino e cervical, ecotextura da parede do folículo pré-ovulatório, o diâmetro e formato do maior folículo.

Uma única dose de hCG é utilizada para induzir a ovulação, aparentemente não existe um padrão ou nível de dose, variando entre 1000 a 6000UI ou mais, sendo que a maioria das doses utilizadas está entre 2000 a 3000UI (BERGFELT, 2000; BRINSKO et al., 2000; LeBLANC, 2006; GINTHER et al., 2008; PYCOCK, 2008; SAMPER, 2008). Inúmeras doses de hCG têm sido utilizadas com efeitos positivos, entretanto, a dose tradicionalmente utilizada é de 2500UI pela via intravenosa (WILSON et al., 1990; MCCUE et al., 2007; ROMANO, 2013).

Em estudo realizado com aplicação de 1500UI de hCG na presença de folículos de 40mm, 97,5% das ovulações ocorrem em até 48 horas (SIEME et al., 2003). Resultado semelhante foi obtido por Camillo e colaboradores (2004) onde a indução com 2500UI de hCG na presença de folículos maiores que 32mm, a taxa de ovulação foi de 97,6% em até 48 horas.

Após 48 horas da aplicação da hCG a ovulação aconteceu em 92,3% (36/39) das éguas tratadas com 1000UI, 85,36% (35/41) das tratadas com 1500UI e 86% (37/43) ovularam quando tratadas com 2000UI de hCG (BEAL, 2008)

Recente estudo realizado por Jacob et al. (2011) utilizando 1000UI de hCG como indutor da ovulação em éguas cíclicas durante quatro ciclos estrais consecutivos, constatou não haver alteração na eficácia da droga em induzir a ovulação. As ovulações aconteceram em

até 48 horas no primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclo em: 88% (55/62 ciclos), 90% (38/42 ciclos), 95% (23/24 ciclos) e 77% (10/13 ciclos), respectivamente.

### **2.3.2.2 Deslorelina, análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)**

O GnRH é um decapeptídeo com peso molecular de 1.183 daltons, sintetizado e armazenado no hipotálamo basal médio. Ele estabelece a ligação entre o sistema humoral e os sistemas endócrino e nervoso, de modo que, em resposta à estimulação nervosa, pulsos de GnRH são liberados no sistema porta-hipotálamo-hipofisário induzindo a hipófise anterior a liberar LH e FSH (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A maioria dos análogos são produzidos pela substituição e/ou remoção dos aminoácidos da molécula natural de GnRH. A deslorelina é um análogo do GnRH produzido pela substituição da glicina na posição 6 pelo triptofano, retirando a glicina da posição 10 e adicionando uma amida na prolina da posição 9 (6-D-triptofano-9-(N-etil-L-prolinamida)-10- Desglicinamida LH-RH) que confere uma maior estabilidade estrutural e metabólica aumentando a meia-vida e a ação do análogo (MONAHAN et al., 1973).

O GnRH e seus análogos podem ser utilizados para iniciar um crescimento folicular, induzir a secreção de FSH em éguas em anestro ou que não desenvolvem folículo pré-ovulatório durante a estação de monta (MCKINNON; VOSS, 1993) e como uma alternativa ao uso da hCG na indução de ovulação em éguas (McCUE et al., 2007). A eficiência da deslorelina em reduzir o número de coberturas, bem como o número de visitas do veterinário para realizar o controle folicular, torna-a de grande auxílio para os programas de TE e IA, especialmente para sêmen refrigerado e congelado (SAMPER et al., 2002).

A taxa de ovulação em éguas de diferentes idades (2-4, 5-9, 10-14, 15-19 e  $\geq 20$  anos), após a aplicação de acetato de deslorelina, foi de 98,5% (éguas de 10-14 anos), evidenciando diferença ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos onde a taxa de ovulação foi de 90,2%, 91,0%, 87,9% e 83,8%, para os grupos 2-4, 5-9, 15-19 e  $> 20$  anos, respectivamente (FARQUHAR et al., 2000).

McCue e colaboradores (2007) comparando o uso de um composto de deslorelina (1,5mg) com o hCG (2500UI), verificaram que o percentual de éguas que ovularam dentro de 48 horas do tratamento foi 36,8%, 88,3% e 90,1% para o controle, hCG e deslorelina, respectivamente. Houve diferença entre os grupos tratados com hormônios e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Dois diferentes doses de deslorelina 750 $\mu$ g (G-D750) e 1000 $\mu$ g (G-D1000) e o hCG (G-H2500 - 2500UI) foram utilizadas para a indução da ovulação, sendo o diâmetro do folículo no tratamento de:  $36,6 \pm 0,2$ mm para o grupo controle (G-CN -não tratado);  $36,3 \pm 0,1$ mm para o grupo tratado com 750 $\mu$ g de deslorelina;  $36,7 \pm 0,2$ mm para o grupo tratado com 1000 $\mu$ g de deslorelina e  $36,3 \pm 0,1$ mm para o grupo tratado com 2500UI de hCG, não havendo diferença ( $p = 0,10$ ). Porém, verificou-se diferença entre o grupo controle e os demais grupos experimentais para taxa de ovulação (G-CN = 61,1% (22/36), G-D750 = 88,9% (32/36), G-D1000 = 89,2% (33/37) e G-H2500 = 88,6% (31/35);  $p = 0,007$ ) (MAIO et al., 2010).

Silva (2011), induzindo a ovulação em éguas com 1000UI de hCG (IV), 0,75mg de deslorelina (IV) e no grupo controle com aplicação de 1mL de solução salina (IV), obteve uma taxa de ovulação em até 48 horas de 96,9% (31/32 éguas), 90% (27/30 éguas) e 30,4% (7/23 éguas), para os grupos hCG, deslorelina e controle, respectivamente. Houve diferença significativa entre os grupos tratados e o controle ( $p < 0,0001$ ).

### **2.3.3 Qualidade do sêmen**

A qualidade do sêmen a ser utilizado em um programa de TE é um fator de extrema importância, uma vez que a seleção dos garanhões é baseada em suas características

morfológicas e desempenho atlético. Raramente a questão da fertilidade é levada em consideração; não sendo incomum ocorrer a redução da recuperação embrionária devido à utilização de sêmen de má qualidade (CAMARGO et al., 2013).

Para a produção de muares, em geral o cruzamento mais utilizado é de éguas com jumentos, do que o cruzamento de garanhões com jumentas. Neste caso, deve-se atribuir atenção especial às particularidades comportamentais e reprodutivas de cada espécie, especialmente ao jumento provedor do sêmen (HENRY et al., 2009). Apesar das particularidades de cada espécie, o comportamento sexual e a qualidade do sêmen de jumentos não foram prejudicados quando éguas foram utilizadas como manequins (CANISSO et al., 2010).

A fertilidade de jumentos normalmente é alta, seja nos cruzamentos intraespécies (jumentas) ou nos cruzamentos interespécies (éguas), quando cruzado com jumentas o sucesso ocorre tanto a campo quanto no sistema controlado de reprodução. No cruzamento com éguas o sucesso é obtido na monta controlada, em virtude especialmente das diferenças comportamentais da espécie (HENRY et al., 2009). Díaz e colaboradores (2009), obtiveram um percentual de éguas gestantes de 32,0% (43/134) através da monta natural com jumentos, e 53,8% (14/26) para éguas inseminadas com sêmen de jumentos, não houve diferença em relação as duas técnicas, entretanto, a menor taxa de éguas gestantes através da monta natural possivelmente seja decorrente da desproporção entre a vagina da égua e o pênis do jumento.

#### **2.3.4 Dia da colheita**

A colheita de embriões equinos é realizada somente a partir do 6<sup>o</sup> dia pós-ovulação (D6), isso porque depois da fecundação, o embrião em desenvolvimento irá migrar do oviduto para o útero entre cinco (HINRICHS; CHOI, 2005) a cinco dias e meio (LOSINNO, 2009) após a ovulação. Rotineiramente os embriões são coletados no 7<sup>o</sup> (D7) ou 8<sup>o</sup> (D8) dia após a ovulação, sendo preferencialmente coletado no D8, pois nessa fase já podem ser visualizados facilmente (HINRICHS; CHOI, 2005). Embriões recuperados nesse período têm alcançado as melhores taxas de gestação após a transferência (SQUIRES; SEIDEL, 1995). A realização de colheitas de embriões D6, em geral, apresentam taxas mais baixas do que as colheitas com sete e oito dias após a ovulação, (SQUIRES et al., 1999). Entretanto, esses embriões com dimensões menores, são melhores para os processo de micromanipulação, como na bissecção (McKINNON et al., 1989), e também tem maior viabilidade após o processo de congelamento e descongelamento (SQUIRES; SEIDEL, 1995; SQUIRES et al., 1999; FLEURY; ALVARENGA, 1999). Colheitas mais tardias, a partir do 9<sup>o</sup> dia após a ovulação (D9) não são realizadas comumente. Nestes casos, o sucesso nas taxas de prenhez após a transferência são bem inferiores às taxas obtidas com embriões D7 e D8 (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Porém, em éguas velhas nas quais o desenvolvimento embrionário e o transporte pelo oviduto podem ser retardados as colheitas em D9 são indicadas (SQUIRES et al., 1999).

Quando as éguas são inseminadas pós-ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada que o esperado (LISA; MEADOWS, 2008). Foi observado um retardo no desenvolvimento embrionário, no qual vesículas embrionárias foram menores, equivalentes a um dia de crescimento, para éguas inseminadas neste período em relação às éguas inseminadas antes da ovulação. Desta maneira, o lavado uterino não deve ser realizado antes do dia sete e meio - oito a partir da ovulação, que é estipulado como dia zero - D0 (AFONSO, 2008; CUERVO-ARANGO et al., 2009).

As taxas de recuperação embrionária não apresentam diferenças significativas quando a colheita é feita em D7, D8 e D9, porém essas taxas diminuem quando as colheitas são feitas em D6 (SLADE et al., 1985; IULIANO et al., 1985). McKinnon e Squires (2007) acreditam que as taxas inferiores de recuperação embrionária, são decorrentes dos seguintes motivos: (1) falha na identificação do embrião no meio da colheita, (2) perda do embrião durante o

procedimento, por causa do seu pequeno tamanho, (3) falha da obtenção do embrião na lavagem uterina causada pela sua grande gravidade específica, (4) devido a não descida do embrião para o útero no dia seis.

Após 917 colheitas de embrião, as taxas de recuperação embrionária no D7, D8 e D9 foram de 49,3%, 58,0% e 54,5%, respectivamente. Não foram verificadas diferenças (FLEURY; ALVARENGA, 1999).

Jacob e colaboradores (2010) após levantamento de quatro estações reprodutivas obtiveram taxa de recuperação embrionária de 62%, a taxa de recuperação nos diferentes dias, indicada pelos autores foram: D6 - 42% (16/38), D7 - 61%, (159/262), D8 - 66% (285/434), D9 - 59% (39/66) e D10 - 56% (05/09), a baixa recuperação de embriões foi observada no D6 ( $p < 0,03$ ), quando comparados com os outros dias. No entanto, as taxas de recuperação foram similares entre D7, D8, D9 e D10.

Camillo e colaboradores (2010) realizaram colheitas de embrião em cinco jumentas da raça Pantanesca, por duas estações reprodutivas e obtiveram uma taxa de recuperação embrionária de 12,5% (1/8), 79,1% (43/58) e 75% (12/26), para o D7, D8 e D9, respectivamente. Esses resultados mostram que houve diferença ( $p < 0,05$ ), entre colheitas realizadas no D7 em relação aos demais dias.

Silva (2011) realizou a colheita de embriões híbridos de éguas Bretão Postier com um Jumento da raça Pêga e obteve uma taxa de recuperação embrionária de 64%, para colheitas realizadas no D9.

Em doadoras da raça brasileiro de hipismo, acompanhadas durante quatro temporadas reprodutivas a taxa de recuperação embrionária foi de 18,1% (2/11), 56% (14/25), 64,5% (189/293), 52,6% (181/344) e 35,3% (6/17), respectivamente para o D6, D7, D8, D9 e D10. Houve diferença ( $p < 0,01$ ) para D6 e D10, em relação aos outros dias (CAMARGO et al., 2013).

Um estudo retrospectivo envolvendo 10 estações reprodutivas, com éguas de diferentes raças, idade e categoria reprodutiva, de 661 lavados uterinos e 937 ovulações, foram recuperados 338 embriões (51,1% e 36,1%, respectivamente). A recuperação embrionária/lavado uterino nos diferentes dias foi de 45,7% (16/35), 46,3% (253/546), 33,3% (21/63) e 47,1% (8/17), para o D7, D8, D9 e D10, respectivamente. Não houve diferença entre nenhum dos dias (PANZANI et al., 2014).

### **2.3.5 Técnica de colheita de embriões**

A colheita de embriões pode ser realizada por dois métodos: o cirúrgico e o não cirúrgico. O primeiro método foi descrito por Allen e Rowson (1975) onde é realizada a lavagem do oviduto para a obtenção de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento. O método não cirúrgico, descrito primeiramente por Oguri e Tsutsumi (1972) é baseado na introdução de um catéter de três vias através da cérvix, posicionado no corno ipsilateral à ovulação, inflando o balão do catéter na base desse corno e procedendo a lavagem.

A colheita de embriões é realizada pela lavagem transcervical uterina, não cirúrgica, sendo considerado um procedimento relativamente simples (VANDERWALL, 2003).

Para iniciar o procedimento de colheita de embriões, uma égua doadora de embriões deve ser colocada em um tronco de contenção de equinos. O médico veterinário deve proceder a limpeza do reto retirando todas as fezes, a cauda do animal deve ser envolta em atadura ou em uma luva de palpação e erguida. Desse modo, evita-se o contato dos pêlos da cauda com o material estéril usado no procedimento e também com a região vulvar. Em seguida deve ser feita assepsia da região do ânus, vulva e períneo, com sabão e uma solução iodada (LOSINNO, 2009), é importante enxaguar bem toda a região, inclusive a abertura vulvar e o lúmen vestibular, a fim de evitar efeitos tóxicos sobre o embrião devido aos resíduos de sabão ou desinfetante (BLANCHARD et al., 2003).

Após a higienização, o técnico calça uma luva estéril obstétrica, e introduz um catéter do tipo *foley* ou sonda de silicone com balão pela vagina e cérvix passando aproximadamente 5cm da sonda no corpo do útero (CARNEIRO, 2005; BORTOT; ZAPPA, 2013) este cateter possui um balão na porção anterior que, quando cheio de ar, impede que o meio de lavagem reflua através da cérvix para a vagina. Na porção posterior o cateter é ligado a um circuito de duas vias, em que uma extremidade corresponde ao recipiente com o meio de lavagem e a outra ao filtro (BORTOT; ZAPPA, 2013) existem outros tipos de sondas disponíveis no mercado (McKINNON; SQUIRES, 2007).

Uma vez o catéter inserido no corpo do útero, o balão é inflado, com aproximadamente 60 mL de ar ou solução salina, é tracionado caudalmente para se ajustar ao óstio cranial da cérvix, e dessa forma os dois cornos uterinos são lavados simultaneamente (FLEURY et al., 2001; SQUIRES et al., 2003; McKINNON; SQUIRES, 2007).

Para se proceder a lavagem, um a dois litros de solução de lavagem previamente aquecida a 30 – 35°C (HUDSON; McCUE, 2004; CARNEIRO, 2005) é introduzida por gravidade para dentro do útero em seguida essa solução é recuperada também por gravidade passando o líquido por um filtro com poros de 75µm de diâmetro (McKINNON; SQUIRES, 2007), que permite a passagem do líquido e retém os possíveis embriões, o filtro deve sempre permanecer com uma pequena quantidade de solução de lavagem, para que os embriões coletados estejam constantemente molhados e não sofram desidratação (BLANCHARD et al., 2003). Nos casos em que a sonda esta ligada diretamente ao filtro o fluxo de recuperação é interrompido com a utilização de pinças ou presilhas, mas pode ser realizada a recuperação constante, onde o fluxo é recuperado em grandes recipientes (RIERA, 2000).

Carvalho e colaboradores (2001) utilizaram dois métodos para a colheita de embriões colheita indireta, onde o fluido foi recuperado com o auxílio do filtro e colheita direta, onde o as frações foram recuperadas em um sistema adaptado de balão volumétrico, onde o fluxo não era interrompido e após a drenagem o fluido permanecia em decantação por 20 minutos. O número de embriões recuperados por tratamento foi de 33/56 (58,9%) para colheita indireta e 26/58 (44,8%) para colheita direta, não tendo sido observadas diferenças significativas, ficando evidente que o fluxo livre não aumentou a taxa de recuperação embrionária.

O procedimento de lavagem é repetido de uma a três vezes (CARNEIRO, 2005), a cada litro de fluido inserido e drenado do útero, é feita a observação do filtro para verificar a presença do embrião, se o embrião não for visível, a operação é repetida até a terceira lavagem, quando o lavado é encerrado e a procura do embrião é feita na lupa (FRANÇA, 2011). Após a drenagem de todo o líquido separa-se o filtro do circuito, o filtro é levado para o laboratório, o balão é desinflado e retira-se a sonda do sistema genital da égua (BORTOT; ZAPPA, 2013).

Já no laboratório o fluido restante no filtro (em torno de 20 a 30mL) é transferido para uma placa de *Petri* estéril, previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião (McKINNON; SQUIRES, 1988). O rastreamento dos embriões é realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10x (LIRA et al., 2009).

Éguas jovens, que nunca ficaram gestantes, ou nas potras, o útero nem sempre suporta um litro de solução de lavagem, sendo aconselhável utilizar volumes menores (METCALF, 2004). Já em éguas que possuam o útero muito grande e pendular, como as éguas mais velhas ou as múltiparas, é aconselhável infundir grandes quantidades de solução de lavagem e massagear o útero pelo reto, dessa maneira suspende-se o embrião no meio de lavagem, auxiliando na drenagem do líquido e do embrião (BLANCHARD et al., 2003). Normalmente consegue-se calcular o volume necessário pela facilidade em que o líquido escorre e também pelo aumento da turgidez do útero (METCALF, 2004).

O líquido drenado do útero deve ser medido para que se recolha a maior parte do líquido infundido (METCALF, 2004), o volume recuperado representa normalmente de 95%

a 98% do volume infundido (IMEL, 1981; CARVALHO, 2000), mas pelo menos 90% do líquido infundido deve ser retirado. Para ajudar nesse procedimento pode-se manipular o útero através do reto e/ou injetar 20UI de ocitocina IV, antes da drenagem do último litro (BLANCHARD et al., 2003). Habitualmente injeta-se 40UI de ocitocina IM quando os três litros de lavagem já foram recolhidos (RAZ et al., 2006).

Com o intuito de verificar o percentual de colheita de embriões a cada lavagem, Hinrichs (1990), lavou o útero de éguas três vezes, utilizando um litro de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*). Ao fim de cada lavagem era realizada a procura dos embriões e do total de 21 embriões foram recolhidos, 12 (57,1%) embriões na primeira lavagem, cinco (23,8%) na segunda e quatro (19,1%) na última.

Alguns pesquisadores sugerem um quarto lavado adicional, que deve ser feito da seguinte forma: aplicação de ocitocina e infusão da solução de lavagem para o quarto lavado que deverá permanecer no útero da égua por aproximadamente três 3 minutos em seguida massageia-se o útero pelo reto e só então, é realizada a drenagem do líquido. Utilizando esse procedimento Hudson e McCue (2004), durante os anos de 2002 e 2003, recuperaram 91 embriões em 209 colheitas, obtendo uma taxa de recuperação embrionária de 43,5%, sendo que 31,6 % dos embriões foram recuperados durante os três primeiros lavados e 32 embriões foram recuperados no lavado extra (4º lavado). Segundo os autores, esse procedimento elevou a taxa de recuperação embrionária em 10%.

Gomes e colaboradores (2014) realizaram 115 colheitas de embriões, em 28 colheitas foi realizado o procedimento normal de três lavados por égua (Grupo Controle), em 87 procedimentos, no terceiro lavado com o útero repleto de Ringer Lactato, as éguas foram colocadas em caminhada por 15 a 20 minutos antes da drenagem do fluido (Grupo Caminhada), os resultados para a recuperação embrionária total, recuperação no 1º, 2º e 3º lavados foram: Grupo Controle: 67,8% (19/28), 52,6 (10/19), 36,8 (7/19), 10,5 (2/19) e Grupo Caminhada: 54,0% (47/87), 44,6% (21/47), 34,0% (16/47), 21,2% (10/47), respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos, houve diferença significativa em ambos os grupos para o terceiro lavado ( $p < 0,05$ ).

Segundo Mckinnon e Squires (2007) se a solução de lavagem estiver límpida, pode ser reutilizada na mesma égua, a reutilização comumente é realizada até três vezes diminuindo os gastos com a colheita do embrião.

O fluido utilizado para a colheita dos embriões pode ser DPBS (VANDERWALL, 2000) ou solução de Ringer Lactato, obtendo taxas de prenhez de 64% versus 57% para as colheitas realizadas com DPBS (ALVARENGA et al., 1992). No Brasil, o Ringer Lactato é a solução mais utilizada (DAELS, 2007).

### **2.3.6 Formação e morfologia embrionária**

No momento da ovulação, o folículo dominante libera o oócito, conhecido como oócito secundário (VANDERWALL, 1996), o qual já foi submetido a diversas transformações durante o desenvolvimento folicular, como a formação da zona pelúcida e a retomada e finalização da primeira divisão meiótica, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar em preparo para a fecundação (GINTHER, 1992).

O desenvolvimento do oócito fica estacionado na fase de metáfase da segunda divisão meiótica (metáfase II), até que ocorra a penetração do espermatozoide. O oócito não fertilizado, envolto pelas células do “cumulus oophorus” (matriz celular gelatinosa) e captado pelas fímbrias presentes no infundíbulo da tuba uterina é rapidamente transportado para a região da ampola, onde vai ocorrer a fecundação (VANDERWALL, 1996).

Para que a fecundação aconteça é necessário que ocorra a migração espermática entre as células do *cumulus*, a união da cabeça do espermatozoide à zona pelúcida e, em seguida, a penetração espermática por uma abertura através da zona pelúcida para atingir a membrana



vitelínica ocorrendo por último, a fusão dos gametas masculino e feminino. Os dois pró-núcleos, masculino e feminino migram para o centro do ovo, os envelopes nucleares se rompem e então se fundem, formando um núcleo diplóide e a primeira célula do conceito, o zigoto (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Vinte e quatro horas após a fecundação ocorre a primeira clivagem e as próximas divisões vão ocorrer entre 12 e 24h de intervalo (BEZARD et al., 1989). A clivagem do zigoto acontece por divisão vertical e as células irmãs resultantes, são denominadas de blastômeros (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O estágio de clivagem do embrião é referido de acordo com o número de células presentes, tal como, uma célula, duas células, quatro e então, até o estágio de 16 células (VANDERWALL, 1996).

Quando o embrião encontra-se no estágio de 16 e 32 células, os blastômeros não são facilmente identificados, pois formam-se junções do tipo “GAP” entre os blastômeros por onde podem carrear pequenos íons e nutrientes. Nessa fase o embrião passa a ser denominado de mórula compacta ou inicial, onde se tem a formação de uma massa compacta de pelo menos 32 blastômeros sendo o último estágio de desenvolvimento do embrião dentro da tuba uterina (BETTERIDGE, 2000).

Segundo Allen (2000), os equinos, diferentemente dos outros mamíferos, retém no oviduto os oócitos não fertilizados e embriões não viáveis, e após um tempo essas estruturas degeneram dentro do próprio oviduto. Assim, caso um oócito não fertilizado seja encontrado, assume-se que provenha de um ciclo antigo e que acompanhou o embrião na sua passagem para o útero (STOUT, 2006).

Os embriões viáveis secretam uma grande quantidade de PGE2 (prostaglandina E2), que promove o relaxamento da musculatura lisa do oviduto e permite que o embrião se desloque, atravesse a junção útero tubárica e entre no útero entre seis e seis dias e meio após a ovulação (ALLEN, 2000).

Ao entrar no útero, a mórula desenvolve a blástula, que é caracterizada pela formação de uma cavidade repleta de fluido (blastocelo) dentro da mórula. Nos estágios iniciais de desenvolvimento dessa blastocelo, o embrião deixa de ser chamado de mórula e passa a ser denominado de blastocisto inicial (VANDERWALL, 1996). O embrião pode chegar ao útero no estágio de mórula tardia ou blastocisto inicial, e possui aproximadamente 0,2mm (SHARP, 2000).

Quando ocorre a formação completa da blastocelo, ela encontra-se envolta por uma camada simples de células de origem ectodérmica denominada de trofoblasto, que vai contribuir para a formação da placenta. De um dos polos do embrião, uma massa celular interna projeta-se para dentro da blastocelo, formando o embrioblasto ou botão embrionário, que é o precursor do embrião propriamente dito. Nessa fase o embrião aumenta rapidamente de tamanho e passa a ser denominado de blastocisto expandido. Quando o embrião entra no útero também ocorre a formação de uma cápsula acelular, entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto, o embrião permanece coberto pela cápsula até cerca de 21 dias de gestação (ENDERS; LIU, 1991). Durante alguns dias a cápsula permanece recoberta pela zona pelúcida, que não eclode durante a expansão do blastocisto, como no caso de outras espécies; mas, que vai tornando-se progressivamente mais fina até a ocorrência da eclosão do embrião (LANDIM E ALVARENGA, 1995).

Aparentemente, a função da cápsula é semelhante a da zona pelúcida, através dela ocorre o trânsito de macromoléculas para o embrião, atua como uma barreira contra ataques virais e bacterianos; protege contra ataques imunológicos de ordem materna, protege contra o estresse mecânico das contrações miométriais (STOUT et al., 2005), é resistente e elástica funcionando como uma barreira física ao conceito durante a fase de migração pelo lúmen uterino (McDOWEEL et al., 1988).

### 2.3.7 Avaliação embrionária

O profissional que trabalha com transferência de embriões deve ser capaz de identificar e avaliar adequadamente os embriões. A avaliação é um procedimento relativamente simples e que não necessita de equipamento sofisticado sendo feita de maneira subjetiva com o auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa), munido de um micrômetro para a avaliação do tamanho (McCUE, 2011). A avaliação deve ser feita utilizando o aumento de 40x (LIRA et al., 2009).

Antes de iniciar a avaliação, o embrião deve ser removido da placa de *Petri* que contém o fluido uterino, para isso é feita a aspiração do embrião, com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25mL, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para outra placa de *Petri* (McKINNON; SQUIRES, 1988). Nessa outra placa o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas em meio de manutenção TQC<sup>®</sup>, Ham F10, Encare<sup>®</sup>, dentre outros (VANDERWALL, 2003). O objetivo dessa lavagem é eliminar a maior quantidade possível de debris celulares e impurezas que podem estar presentes (VANDERWALL, 2003; McCUE, 2011).

Concluída a lavagem, o embrião é mantido no meio de manutenção e avaliado antes de ser transferido para receptora, ou pode ser acondicionado ao resfriamento para transporte (DAELS, 2007) ou criopreservado (McCUE, 2011).

A classificação do embrião consiste em avaliar o estágio de desenvolvimento, a qualidade, conforme recomendações da IETS, descritas por McKinnon e Squires (1988), o tamanho dos embriões também deve ser avaliado, e, é fundamental diferenciar os embriões de ovócitos não fertilizados (não rolam quando manipulados, diferente do embrião) e de estruturas não embrionária que possam vir a ser coletadas durante o procedimento de lavagem (McCUE, 2011).

Em relação ao estágio de desenvolvimento, segundo McKinnon e Squires (1988), em colheitas realizadas entre os dias seis e oito após a ovulação, são encontrados os seguintes estágios embrionários:

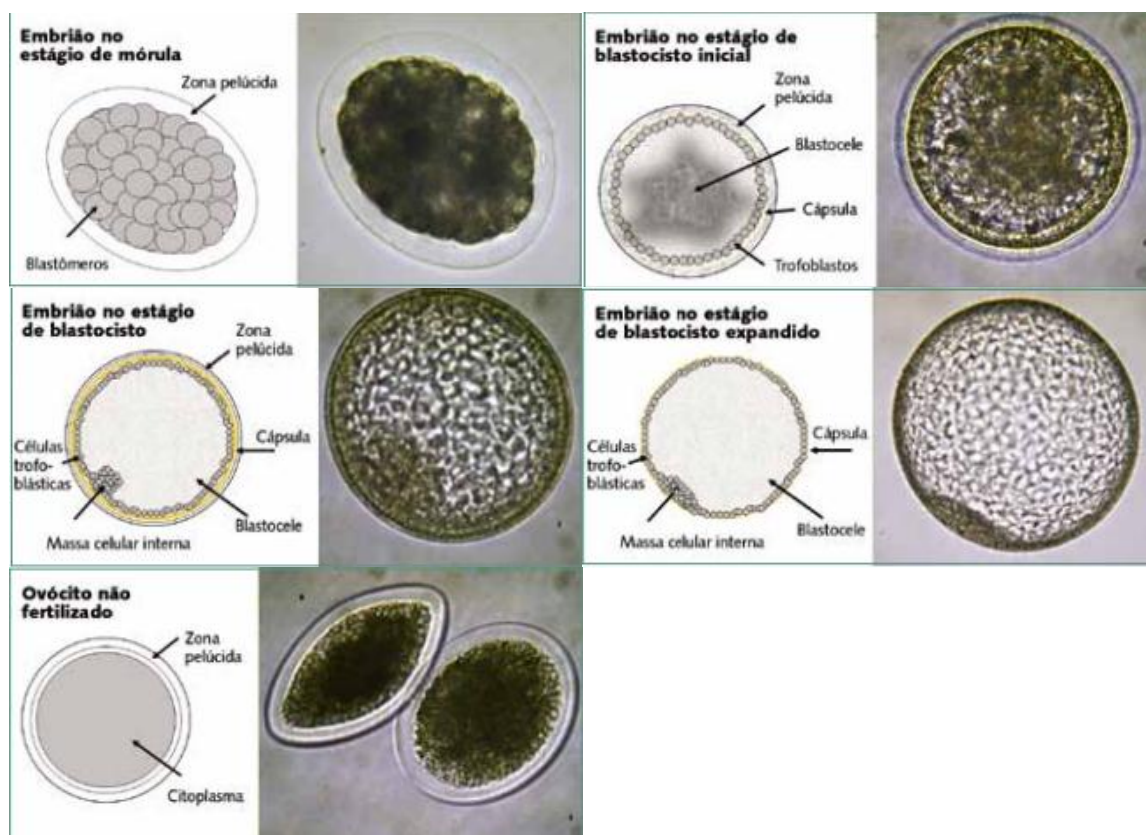
- Mórula (Mo): 1<sup>o</sup> estágio presente no útero, massa compacta formada por 32 blastômeros ou mais (embrião de seis dias)
- Blastocisto inicial (Bi): o número de blastômeros continua aumentando e ocorre a formação da blastocele e trofoblasto (embrião entre seis e sete dias)
- Blastocisto (Bl): aparecimento de uma cápsula, afinamento da zona pelúcida e blastocele totalmente formada (embrião de sete dias)
- Blastocisto expandido (Bx): perda da zona pelúcida e eclosão do embrião (oito dias).

Uma descrição mais detalhada sobre os estágios de desenvolvimento embrionário foi apresentada por McCue (2011), onde são apresentadas as características morfológicas e as médias de tamanho dos embriões em diferentes estágios (Quadro 1), e também representação esquemática e foto dos respectivos embriões (Figura 2).

**Quadro 1.** Estágios de Desenvolvimento do Embrião Equino.

ESTÁGIO	TAMANHO ( $\mu\text{m}$ )	DESCRIÇÃO
Mórula	150 a 200	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores; borda externa dos blastômeros de aparência “serrilhada”; possibilidade de identificação do espaço perivitelínico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento à manipulação ( <b>Figura 2A</b> ).
Blastocisto inicial	150 a 250	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros; mínimo espaço perivitelínico, tamanho semelhante ao da mórula ( <b>Figura 2B</b> ).
Blastocisto	150 a 300	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina ( <b>Figura 2C</b> ).
Blastocisto Expandido	300 a > 1000	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade ( <b>Figura 2D</b> ).
Ovócito não fertilizado (UFO)	125 a 150	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola à manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados ( <b>Figura 2E</b> ).

Fonte: McCUE (2011)



**Figura 2.** Estágios embrionários: Embrião equino (Grau I) no estágio de mórula (A); Embrião equino (Grau I) no estágio de blastocisto inicial (B); Embrião equino (Grau I) no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível (C); Embrião equino (Grau I) no estágio de blastocisto expandido (D); Par de ovócitos não fertilizado (E)

A qualidade de um embrião relaciona a morfologia com a viabilidade, para tanto, é atribuído um escore que vai de um a quatro, considerando o formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da zona pelúcida (McKINNON; SQUIRES, 1988 adaptado por McCue, 2011) (Quadro 2). A qualidade de um embrião é um dos fatores que exerce maior efeito nas taxas de prenhez (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

**Quadro 2.** Sistema de quatro pontos para classificação de embriões equinos em relação a qualidade.

GRAU	COMENTÁRIO	DESCRIÇÃO
I	Excelente	Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação
II	Bom	Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula
III	Ruim	Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula
IV	Degenerado ou Morto	Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião.
UFO	UFO	Ovócito não fertilizado

Fonte: Adaptado de McCUE (2011).

O diâmetro de embriões coletados em seis e meio, sete e oito dias após a ovulação, variou de 160-260µm, 160-840µm e 380-1640µm, respectivamente (MOUSSA et al., 2004).

Em geral a maioria dos embriões equinos coletados mede entre 0,4 – 1mm de diâmetro, e encontra-se em estágio de blastocisto inicial a blastocisto expandido. Os embriões de baixa qualidade, classificados no escore três em diante e aqueles que são menores do que o normal para a sua idade, resultam em baixas taxas de prenhez em relação aos de grau I e II (SQUIRES, 2003).

Coelho (2010), trabalhando com jumentas da raça Pêga, realizou colheitas no D7 e obteve uma taxa de recuperação embrionária de 60% (21/35), os estágios embrionários encontrados foram: mórula compacta – 9,52% (2/21), blastocisto – 38,1% (8/21) e blastocisto expandido- 52,38% (11/21), apenas uma mórula e um blastocisto foram classificados como grau II, os demais embriões foram classificados com grau I. Apenas seis dos 21 embriões foram medidos a fresco, sendo quatro blastocistos expandidos - 250 a 525µm (média 383,3µm), um blastocisto – 187,5µm e uma mórula compacta - 150µm.

Em jumentas da raça Amiata, foram recuperados 30 embriões de 60 ciclos estrais (50%) entre D7 e D9, 29 foram classificados como grau I ou II (excelente para bom) e um foi classificado como grau III (proveniente de uma égua velha com mais de 20 anos), 10 embriões coletados entre os dias oito e nove tiveram seu diâmetro mensurado, o tamanho médio dos embriões foi de 666µm (204,8 a 768µm) e 1005µm (537,6 a 1792µm), para embriões com oito e nove dias, respectivamente (PANZANI et al., 2012).

Panzani e colaboradores (2014) realizaram um estudo retrospectivo com éguas de diferentes raças, durante as estações reprodutivas de 2002 até 2011. Ao todo 326/338 (96,4%) foram avaliados como blastocisto expandido, 11/338 (3,2%) blastocisto inicial e 1/338 (0,02%) como mórula. Quanto à qualidade embrionária foram obtidos 307/338 (90,8%) embriões grau I, 18/338 (5,3%) grau II, 11/338 (3,2%) grau III e 2/338 (0,6%) grau IV. O diâmetro de 215 embriões para os diferentes dias de colheita foi: D7 (n = 12) – 404,91µm (± 306,5), D8 (n = 189) – 660,29µm (±328,33), D9 (n = 10) – 912,39µm (±665,11) e D10 (n = 4) – 1224,5µm (±821,04).

Terminada as avaliações embrionárias o embrião já pode ser destinado seja para transferência direta para o útero da receptora, ou transportado para ser transferido para uma receptora que esteja em outro lugar ou ainda criopreservado, lembrando que a viabilidade dos embriões no meio de manutenção, chamado de meio “holding” é de cerca de oito horas. No entanto, a viabilidade também depende das condições ambientais e do laboratório, assim como da qualidade do próprio embrião (LOSINNO, 2009).

#### **2.4. Mobilidade Embrionária e Reconhecimento Materno**

Uma interação ininterrupta e completa entre o conceptus e o útero, é essencial para o estabelecimento e manutenção da gravidez (MEIRA et al., 2012). Com a ocorrência da fertilização, ainda no oviduto o embrião indica sua presença, interrompe o ciclo estral e mantém a gestação, num processo conhecido como reconhecimento materno da prenhez (SHORT, 1969). No caso dos equinos, diferentemente de outras espécies, ainda não está claro como o embrião sinaliza sua presença para que ocorra o reconhecimento materno (KLOHONATZ et al., 2013). Apesar da necessidade de maiores esclarecimentos a respeito do reconhecimento materno, muitos estudos relatam a importância da interação entre o embrião e o útero, garantindo dessa maneira a função e secreção do corpo lúteo, durante a gestação precoce (SILVA et al., 2005).

Após a entrada do embrião no útero, o conceptus se movimenta livremente por todo o lúmen endometrial, até o 15<sup>o</sup> - 16<sup>o</sup> dia após a ovulação, quando o mesmo se fixa na base de um dos cornos uterinos (GINTHER, 1983), possivelmente essa mobilidade da vesícula seja a responsável pela inibição da luteólise do corpo lúteo (GINTHER, 1998). As dobras endometriais, em direção longitudinal (GINTHER, 1983), em conjunto com as prostaglandinas produzidas pelo embrião que estimulam as contrações uterinas, sejam características auxiliares na movimentação da vesícula (STOUT; ALLEN, 2001). Nas jumentas, a migração do embrião pelo útero ocorre da mesma maneira que em equinos, entretanto alguns autores relatam diferenças em relação ao dia de fixação embrionária nas jumentas em relação às éguas (BESSENT; GINTHER, 1987; MEIRA et al., 1988).

#### **2.5 Fatores que Afetam a Taxa de Gestação**

A taxa de gestação é afetada pela receptora, pelo embrião, pela doadora (ALONSO, M.A., 2008), e também pelo tipo de transferência. A receptora é considerada o maior obstáculo nas taxas de gestação pós TE. Por isso, a seleção e manejo adequado desses animais influenciará no sucesso de todo o processo (CARNEIRO, 2005). Uma boa seleção vai determinar a qualidade do plantel de receptoras, enquanto que um manejo ideal irá fornecer o ambiente adequado para a maximização da taxa de prenhez e redução da perda embrionária (ALONSO, M.A., 2008).

##### **2.5.1 Seleção de receptoras**

A receptora é considerada o fator mais importante da TE, já que ela é a responsável por reconhecer o embrião e fornecer as condições necessárias para o desenvolvimento do mesmo (FLEURY et al., 2007).

A seleção de uma receptora deve ser criteriosa, responsável e, sobretudo, visando à eficiência do programa de TE. Os critérios de seleção da égua receptora incluem tamanho, idade, temperamento dócil e bom desenvolvimento mamário, ter um ciclo estral normal, e livres de problemas reprodutivos (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; SQUIRES et al., 2003), é importante também que não seja um animal agitado pois este representa um risco para os profissionais e para a futura gestação, devido ao estresse. Devem ser selecionados animais cabresteados e possíveis de serem manejados (BLANCHARD et al., 2003; SAMPER et al., 2007). Os requerimentos sobre o status reprodutivo variam entre os

centros de reprodução, podendo variar desde éguas que tenham parido anteriormente (avaliação da habilidade materna), ou éguas virgens, eliminando a possibilidade de laceração cervical ou alterações uterinas prévias (HINRICHS, 1993; SAMPER et al., 2007).

Em relação à idade, o ideal são éguas entre três a 10 anos, visto que a idade é um importante fator predisponente para a degeneração endometrial que pode comprometer a habilidade de manter a gestação (SQUIRES et al., 1999; MORRIS; ALLEN, 2002; STOUT, 2006). Carnevale e colaboradores (2000) observaram a taxa de prenhez de receptoras entre dois e nove anos e esta não diferiu estatisticamente das receptoras entre 10 a 18 anos. Porém, a taxa de perda embrionária foi maior nas receptoras entre 10 e 18 anos (13,3% versus 20,5%). Em estudo conduzido por Rabelo e colaboradores (2009), a taxa de gestação foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) nas receptoras com faixa etária  $> 11$ anos (5/13 – 38,46%), quando comparadas com as receptoras entre seis a oito anos (12/15 – 80%) e entre nove e 11 anos (13/17 – 76,47%), mas não apresentou diferença em relação as receptoras mais jovens na faixa dos três a cinco anos (11/16 – 68,75%).

Stanton e colaboradores (2004) relataram que a incidência de cisto endometrial aumenta com a parturidade e com a idade, pois a maioria das éguas afetadas apresenta mais de 10 anos. Em uma população de éguas férteis e subférteis a expectativa para ocorrência de cistos é de 13% a 22%. Em um levantamento os autores avaliaram que 73,1% dos cistos que estavam presentes eram em éguas com mais de 14 anos, e apenas 29,1% dos cistos estavam presentes em éguas que apresentavam de sete a 14 anos.

Um fator na seleção para o qual não se dá muita importância é o tamanho da receptora em relação à doadora e garanhão (STOUT, 2006). Uma série de estudos demonstraram que a discrepância entre o tamanho genético do embrião e a receptora afeta em vários aspectos o desenvolvimento intrauterino e pós-natal. Tamanho materno inadequado pode levar a um maior ou menor crescimento fetal e apesar de um grau de compensação na vida pós-natal, este tamanho é mantido na maturidade (ALLEN et al., 2002; 2004). Tanto o crescimento uterino aumentado ou retardado alteram a função pós-natal cardiovascular, endócrina e metabólica (FORHEAD et al., 2004) e, aparentemente a utilização de receptora que difere marcadamente em tamanho com a doadora vai influenciar o tamanho do potro na maturidade. E em casos ainda mais graves, pode aumentar a morbidade durante a vida intrauterina, imediata pós-natal e, possivelmente, na vida adulta (STOUT, 2006).

A sanidade da receptora tem vital importância, sendo que deve estar livre de quaisquer moléstias infectocontagiosas, em especial Anemia Infecciosa Equina, babesiose, leptospirose e adenite equina, que podem comprometer a sanidade de todo o plantel e posteriormente causar declínio nas taxas de prenhez e aumento nas taxas de perda embrionária (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Devem também apresentar boa condição corporal e passar por um exame reprodutivo completo (SQUIRES; SEIDEL, 1995; McCUE et al., 1999; STOUT, 2006). Faz-se a observação da genitália externa, sendo necessário ter uma conformação vulvar normal. Qualquer sinal de alteração, como presença de fluido, cistos, ar ou debris no útero, tumores ou outras anormalidades ovarianas, devem determinar o descarte do animal. Aproximadamente 15 a 20% das éguas examinadas são descartadas. A égua deve ter uma cérvix íntegra e não muito torta (STOUT, 2006). Como o exame não é feito de uma forma completa, há uma grande quantidade de éguas aceitas e que não estão aptas reprodutivamente (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

### **2.5.2 Escolha da receptora no dia da TE**

A escolha da receptora no dia da TE tem influência direta sobre a taxa de gestação. Alguns aspectos devem ser levados em consideração neste momento, sendo os mais importantes o dia pós-ovulação e as características uterinas da receptora ao exame de palpação e ultrassonografia (WILSHER et al., 2006). As receptoras devem ser avaliadas

anteriormente ao momento da transferência, devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião, cada veterinário possui um método próprio de avaliação das receptoras (FLEURY et al., 2006). Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular) e não deve haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (CARNEVALE et al., 2000).

Nos resultados de Alonso (2007), os animais apresentando o útero mais tubular e de ecogenicidade mais homogênea apresentaram maiores taxas de prenhez comparando-se com aqueles com útero menos tubular e mais heterogêneo. Com isso, a avaliação da morfoecogenicidade uterina deve ser considerada na seleção da receptora. A morfoecogenicidade uterina é o aspecto de tubularidade e homogeneidade à palpação retal e ultrassonografia.

A sincronia entre embrião e ambiente uterino é essencial para o estabelecimento da gestação. O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, sendo que um embrião em um útero assincrônico pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes à fase na qual ele se encontra, afetando o estabelecimento da gestação (WILSHER et al., 2006).

Atualmente, a sincronização entre doadora e receptora é uma técnica realizada de maneira relativamente simples em éguas cíclicas. Geralmente, administra-se uma única injeção intramuscular de PGF2 $\alpha$  ou análogo na égua doadora, um a dois dias antes da aplicação do mesmo protocolo nas receptoras. Ambas devem estar entre o 6<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia do diestro e o exame ultrassonográfico dos ovários deve revelar a ausência de um grande folículo pré-ovulatório que pode ovular rapidamente (ALLEN, 2001). Outra técnica de sincronização praticada consiste na administração de progesterona injetável ou sintética orais durante nove ou dez dias, iniciando nas doadoras de embrião um ou dois dias à frente das receptoras (DRIANCOURT; PALMER, 1982). Removendo-se a progesterona e aplicando-se a PGF2 $\alpha$ , as éguas exibirão estros em torno de três dias (BERGFELT, 1999).

Em todos os protocolos de sincronização empregados, monitora-se o crescimento folicular por ultrassonografia e utiliza-se hCG, GnRH ou EPE para induzir ovulação nas éguas receptoras dentro de 48 horas depois que a doadora for inseminada (DUCHAMP et al., 1987).

O grau de assincronia entre a ovulação da doadora e da receptora é entre -1 (ovulação um dia antes da doadora) a + 3 (ovulação três dias após a doadora), não sendo as taxas de gestação entre elas diferentes neste intervalo. Trabalhos mais recentes têm mostrado que a sincronia entre doadora e receptora pode ser mais flexível do que se pensava entre -1 a +5, até porque pode-se realizar a colheita do embrião em dias diferentes (McKINNON; SQUIRES, 2007; JACOB et al., 2012).

Um estudo realizado por Jacob e colaboradores (2012), mostrou as taxas de prenhez para o seguinte grau de sincronia foram: D-1 (71%, 05/07), D0 (77%, 20/26), D1 (68%, 48/71), D2 (63%, 61/97), D3 (66%, 57/87), D4 (76%, 63/83), D5 (61%, 36/59) e D6 (27%, 04/15), mostrando que o D6 para o grau de sincronia teve menor taxa de gestação que todos os outros dias, mas nenhuma diferença foi encontrada entre os dias D-1 a D5.

Muitos estudos já foram realizados para avaliar o dia ideal do ciclo para a TE e o uso de drogas para melhorar o perfil progesterônico da égua receptora. O foco dos estudos são os antiprostaglandínicos, progesterona e mais recentemente o hCG e análogos do GnRH (FLEURY et al., 2007).

Souza (2006) demonstrou que a aplicação de hCG no dia 0 ou 1 pós-ovulação aumentou o número de receptoras com útero tubular e ecogenicidade uterina homogênea e tônus uterino bom e excelente. Sendo esta uma interessante ferramenta para melhorar a

chance de a receptora apresentar características desejáveis quando o número de receptoras for limitado. Alternativa interessante é o uso diário de progesterona, permitindo uma antecipação no uso da receptora. O uso diário de progesterona, a partir do dia da ovulação, permitiu, o uso das receptoras, já no segundo dia pós-ovulação, gerando taxas de gestação próximas de 70% contra taxas de 30% para receptoras que não receberam a suplementação com progesterona (CAIADO et al., 2007).

Na tentativa de utilizar receptoras que ovularam antes da doadora, Wilsher e colaboradores (2006), trataram com ácido meclofenâmico receptoras que ovularam de dois a cinco dias antes da doadora, iniciando no 9º dia pós-ovulação; taxas de 85% de gestação foram obtidas naquelas que ovularam dois ou três dias antes.

O uso de receptoras na fase de transição ou em anestro, também é uma boa maneira de disponibilizar um maior número de receptoras, um ciclo estral artificial é induzido utilizando estrógeno e progesterona. As taxas de prenhez em égua com ciclos naturais foram de 67,8% (400/590) semelhantes à taxa em receptoras com ciclo artificial - 55,6% (10/18) (CARNEVALLE et al., 2000). A dose adequada de progestágenos deve ser administrada nas receptoras com ciclo artificial induzido até haver produção suficiente de progestágenos endógenos (McKINNON et al., 1988).

Os resultados a respeito da taxa de gestação após a TE de asininos, para éguas ou jumentas receptoras, não são animadores, Allen e colaboradores (1985) e Vendramini e colaboradores (1997), reportaram uma taxa de gestação de apenas 15% aos 50 dias de gestação. Camillo e colaboradores (2010) após a transferência de 58 embriões pra jumentas receptoras, resultaram em 13 (22,4%), 10 (17,2%) e 9 (15,5%) gestações nos dias 14, 25 e 50 respectivamente. Resultado mais satisfatório foi obtido por Panzani e colaboradores (2012) onde a taxa de gestação foi de 60% (6/10) para embriões transferidos para jumentas e de 75% (3/4) quando os embriões foram transferidos para o útero de éguas, todas as receptoras de ambas espécies estavam entre os dias cinco – nove pós ovulação no momento da transferência. Essas divergências entre éguas e jumentas indicam que apesar do padrão semelhante na fisiologia reprodutiva, essas duas espécies diferem em algumas manifestações reprodutivas (WILBORN E PUGH, 2011).

### **2.5.3 Método de transferência**

Antigamente a transferência de embriões equinos era realizada de maneira cirúrgica através de uma laparotomia com incisão na linha média ventral, sob anestesia geral (IMEL et al., 1981) ou através do flanco, usando anestesia local e sedação da égua (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Atualmente a técnica mais utilizada é da transferência não cirúrgica transcervical, que consiste na deposição do embrião no corpo do útero da receptora, após atravessar a cérvix, com uma pipeta de inseminação ou um inovulador (LIRA et al., 2009).

A utilização da técnica cirúrgica demonstra taxas de prenhez mais homogêneas, em torno de 65 a 80% (FLEURY; ALVARENGA, 1999, SQUIRES et al., 1999). Carnevale e colaboradores (2000) compararam os métodos não-cirúrgico e cirúrgico de TE e obtiveram taxas de prenhez aos 50 dias de 47,4% (37/78) e 68,3% (381/558), e aos 120 dias de 39,7% (31/78) e 57,9% (323/558), respectivamente. No entanto, esses autores salientaram que os resultados superiores obtidos pela TE cirúrgica provavelmente tenham sido devido à melhor qualidade dos embriões utilizados. Entretanto, Jacob e colaboradores (2002) e Gomes e colaboradores (2004), em programas comerciais de TE, mostraram que o método transcervical, gera taxas de prenhez consistentes em torno de 70%, o que não justifica o procedimento cirúrgico.

A TE não cirúrgica apresenta algumas vantagens em relação à cirúrgica: é mais rápida, mais barata e melhor para o bem-estar das receptoras (STOUT, 2006) além de que,



operadores experientes podem conseguir taxas de gestação acima dos 80% quando receptoras em boas condições estão disponíveis (JASKO, 2002).

No procedimento de inovulação o embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 ou 0,5mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar, deve se aspirar três colunas de meio, intercaladas com coluna ar, e na segunda coluna do meio de manutenção deve estar contido o embrião. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA et al., 2004). Recentemente, pesquisadores e veterinários tem utilizado a pipeta de inseminação artificial para realizar a inovulação, onde o embrião é envasado da mesma maneira que nas palhetas. Contudo, vários outros aplicadores também tem sido descritos, como o modelo Hannover de transferência de embriões bovinos, o aplicador modelo Francês e uma adaptação de tubo de aço + tubo de polietileno (FRANÇA, 2011). A escolha do tamanho da palheta e o tipo de pipeta vão depender da preferência do técnico, bem como do tamanho do embrião. Os embriões de menores dimensões são mais facilmente colocados em palhetas de 0,25mL, enquanto que os embriões maiores podem não caber nas palhetas ou não passar pela sua abertura (JASKO, 2002).

Peres e colaboradores (2002) não observaram diferenças significativas nas taxas de prenhez pós-transferência com a utilização desses quatro modelos de transferidores, a taxa de gestação foi de 59% para o transferidor Frances, 54% com pipeta de inseminação artificial, 44% com o transferidor alemão e 62% com o aparelho comum constituído por um tubo de aço inox, dentro do qual perpassava-se um tubo de polietileno contendo o embrião.

Após o envase do embrião, a pipeta de IA, ou o aplicador deve ser envolvido por uma bainha de plástico estéril: “camisa sanitária”, com o intuito de minimizar a contaminação do embrião (COSTA, 2010).

Um método alternativo para se executar a inovulação de embriões equinos, consistindo em depositar o embrião no útero da receptora mediante uma injeção intrauterina guiada por ultra-sonografia. Silva e colaboradores (2004) relataram que essa nova técnica foi comparada ao método transcervical e não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez, as quais foram de 76,9% e 78,9%, respectivamente. Entretanto, trata-se de uma técnica mais onerosa e complexa cuja aplicação se restringe a situações especiais.

## **2.6 Sexagem de Embriões**

Na indústria equina, o desejo de identificar o sexo do concepto é crescente em programas de TE produzindo resultados promissores e de alta confiabilidade (AURICH; SCHNEIDER, 2014).

A identificação do sexo promove uma elevação nos ganhos e também o melhor gerenciamento das criações. Entre as inúmeras vantagens fornecidas pela técnica, podemos citar: (1) economia com manutenção de receptoras prenhez de embriões com o sexo indesejado (alimentação, sincronização, manejo); (2) descarte ou congelamento de embriões com menor interesse econômico (ALONSO, R.V., 2008); (3) uniformizar o plantel, para um determinado sexo, como por exemplo, fêmeas no caso da raça de polo argentino, que são preferidas nas competições (HERRERA et al., 2014), ou quem sabe somente nascimento de mulas ao invés de burros, já que essas fêmeas além das qualidades de trabalho também podem ser empregadas como receptoras (RIBEIRO; MELO, 2006); (4) maior valor agregado ao embrião, em virtude da programação adequada do uso do produto; (5) determinação de características e diagnóstico de doenças genéticas (CHOI et al., 2010); (6) inibição de abortos de gestações ao redor de dois meses, tipo de conduta que acontece muitas vezes quando o proprietário ao ser informado do sexo do feto após a realização da sexagem fetal por ultrassonografia, decide não levar adiante a gestação da égua, ocasionando prejuízo financeiro

e também à saúde dos animais, além, é claro, de uma questão ética (AURICH; SCHNEIDER, 2014).

A primeira etapa da determinação do sexo do indivíduo ocorre no momento da fecundação com o estabelecimento do sexo cromossômico do zigoto. Porém o processo de diferenciação sexual ocorrerá apenas algum tempo depois (JOST; MAGRES, 1993). O embrião, no estado indiferenciado, tem potencial para dar origem a gônadas e órgãos genitais masculinos ou femininos. O caminho a ser seguido no processo de diferenciação sexual é bastante complexo, envolvendo genes autossomais e ligados aos cromossomos sexuais X e Y. Diferentes produtos gênicos desencadeiam a diferenciação, a qual pode ser dividida em etapas sucessivas. Inicialmente, observa-se o estabelecimento do sexo genético (XX ou XY), em segundo lugar o sexo gonádico (testículo ou ovário), em terceiro o sexo hormonal e, por último, o sexo fenotípico (SHORT, 1982). O sexo gonádico normalmente em mamíferos é determinado pelo sexo genético (POLANI, 1982), com a presença do cromossomo Y associado ao desenvolvimento testicular (BEATTY, 1970). Na espécie equina a diferenciação gonadal acontece entre 39 e 45 dias de gestação (JOST; MAGRES, 1993).

Jacobs e Ross (1966) revelaram que o cromossomo Y possui uma sequência gênica específica associada ao desenvolvimento do testículo chamada inicialmente de *testis determining factor*/fator determinante testicular (TDF/FDT). A chave genética presente no braço curto do cromossomo Y, gatilho para a gônada se diferenciar em testículos preferencialmente que em ovários, foi identificada quase 30 anos após, sendo denominado de *SRY (sex determining region of the Y chromosome)* (SINCLAIR et al., 1990). O gene SRY codifica uma proteína de 204 aminoácidos que atua como fator de transcrição, ativando uma cascata de eventos com papel fundamental na indução do desenvolvimento masculino e na inibição da diferenciação feminina (MOREIRA, 2002). Dessa forma, o testículo desempenha função primordial no processo de diferenciação sexual. Sua presença está associada ao desenvolvimento dos órgãos anexos, genitália masculina e bloqueio dos órgãos femininos, enquanto que a sua ausência permite o desenvolvimento dos órgãos sexuais femininos. Falhas nas funções testiculares ou na ação das substâncias por eles secretadas resultam em inúmeras anormalidades reprodutivas (JOHNSON, 1983).

A identificação do sexo de embriões já foi alvo de estudo de diversos grupos de pesquisadores desde os anos 80, período em que diferentes métodos foram descritos, tais como: 1) utilização de antígeno H-Y no meio de cultivo embrionário (BETTERIDGE et al., 1981; WACHTEL, 1984; RAMALHO et al., 2004); 2) análises citogenéticas (KING, 1984; VAN VLIET et al., 1989; SCHRÖDER et al., 1990) e 3) técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH – *fluorescence in situ hybridization*) (BETTERIDGE et al., 1981; VAN VLIET et al., 1989). Em geral todas essas análises eram impraticáveis e pouco confiáveis para a utilização na prática de transferência de embriões. Entretanto, foi com o advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) que o procedimento de sexagem de embriões tornou-se viável e passou a ser utilizado (ALONSO, R.V., 2008).

O procedimento para identificação do sexo de embriões pode ser dividido basicamente em duas etapas: 1) micromanipulação embrionária e 2) análise de DNA (SCHRÖDER et al., 1990; HERR; REDD, 1991).

Para que o método de sexagem embrionária seja considerado ideal, dois pontos são imprescindíveis: 1) a porcentagem de embriões que podem ser corretamente sexados, e 2) a viabilidade pós-transferência de embriões sexados. O primeiro ponto envolve duas características: eficiência e precisão (ou exatidão). Eficiente significa que a técnica permite sexar o maior número possível dos embriões. Precisão significa, neste caso, que os embriões sexados como XX sejam realmente fêmeas, e os sexados como XY, sejam machos. A segunda condição (viabilidade) depende do grau de dano que a técnica de sexagem causa aos

embriões, e que ela possa ser realizada em embriões suficientemente jovens para serem transferidos. Além disso, a sexagem deve ser reproduzível, barata e rápida o suficiente para permitir avaliar um grande número de embriões em pouco tempo, só assim a técnica pode tornar-se viável comercialmente (VAN VLIET et al., 1989).

### **2.6.1 Micromanipulação embrionária**

A micromanipulação de embriões permite a retirada de uma biópsia do embrião que pode ser utilizada para determinar o sexo embrionário, analisar características desejáveis, como pelagem ou produção de leite, e ainda determinar a presença de doenças hereditárias. No início desses procedimentos, era necessário remover uma grande parte do embrião (metade), o que muitas vezes inviabilizava seu desenvolvimento após a transferência. Entretanto, com o advento da PCR, a partir de uma pequena quantidade de células é possível amplificar sequências específicas do DNA (HUHTINEN et al., 1997).

A biópsia de embriões pode ser realizada com o uso de métodos químicos, mecânicos e auxiliado por laser (CULLINGFORD, 2010). A biópsia química é realizada com a aplicação de uma solução ácida, em um único local da zona pelúcida, até criar um furo, entretanto é pouco utilizada, pois acidifica o meio de manutenção do embrião, promove lise dos blastômeros, influenciando diretamente na viabilidade do mesmo (INZUNZA et al., 1998 *apud* CULLINGFORD, 2010). A biópsia mecânica da zona pelúcida pode ser realizada com o uso de uma micropipeta ou com uma microlâmina. Com a micropipeta é feito um furo direto na zona pelúcida e depois um número específico de células embrionárias é aspirada. Já com a microlâmina, é feita a secção do embrião em um corte longitudinal e uma pequena parte do embrião é removido (MALTER; COHEN, 1989 *apud* CULLINGFORD, 2010). Na perfuração auxiliada por laser, um feixe de lasers de várias intensidades e duração é emitido na borda do embrião, longe das células embrionárias, criando um buraco para acesso ao material genético. Esse tipo de procedimento cria um furo mais preciso (TADIR et al., 1989;1990 *apud* CULLINGFORD, 2010), e normalmente é usado junto ao método de aspiração (CHOI et al., 2010).

As técnicas mecânicas de obtenção de células embrionárias ainda são as mais utilizadas, sendo que a microaspiração causa menos danos ao embrião e à zona pelúcida sendo a viabilidade de embriões biopsiados por essa técnica presumivelmente mais elevada que embriões microseccionados. Entretanto, a técnica de microseccção é mais fácil de ser executada (BREDBACKA, 2001). Comparando as técnicas de aspiração e secção, a taxa de gestação foi de 75% (6/8) e 40% (6/15), respectivamente (SEIDEL JR. et al., 2010).

Uma estrutura chamada cápsula, presente no embrião equino, é considerada por muitos autores como a grande barreira para a micromanipulação embrionária, uma vez que danos nessa estrutura prejudicam de maneira significativa a taxa de gestação após a biópsia (HUHTINEN et al., 1997; STOUT et al., 2005; CHOI et al., 2010; CULLINGFORD et al., 2010). A cápsula é uma estrutura composta por glicoproteínas semelhantes à mucina, que se forma entre o trofoblasto e a zona pelúcida, após a entrada do embrião no útero, a partir do estágio de blastocisto (por volta do 6<sup>o</sup> a 7<sup>o</sup> dia após a ovulação) e permanece até o 23<sup>o</sup> de gestação (STOUT et al., 2005). Acredita-se que a cápsula desempenha as mesmas funções que a zona pelúcida (que é perdida com a expansão do embrião). Ela tem grande importância durante a fase de migração e reconhecimento materno (SHARP, 2000). A cápsula de embriões de jumentos possui a mesma composição de carboidratos que a cápsula de embriões equinos, mas há uma substancial diferença na quantidade e proporção de ácido siálico, sendo menor para os embriões asininos. O tamanho do embrião também é similar entre as espécies, entretanto o peso da massa seca da cápsula de embriões de jumentos é cerca de 50% da do cavalo, sugerindo que ela seja mais fina (ORIOLE et al., 1993), o que eventualmente poderia

facilitar os procedimentos de micromanipulação embrionária de embriões asininos, e até mesmo de embriões provenientes do cruzamento das duas espécies.

Stout e colaboradores (2005) demonstraram a importância dessa estrutura em embriões equinos, quando 15 embriões transferidos após a remoção da cápsula, não resultaram em nenhuma gestação, enquanto quatro de seis embriões com a cápsula intacta desenvolveram normalmente a gestação. A inviabilidade na manutenção da gestação foi associada à secção de embriões em estágios onde a cápsula já está formada.

Entretanto, na produção de gêmeos monozigóticos, mesmo após a bipartição os hemiembriões conseguem se desenvolver, e esse tipo de técnica é considerado inclusive, uma alternativa para aumentar as taxas de gestação e melhorar a eficiência reprodutiva. Dez mórulas, coletadas entre 144 e 156 horas (seis a seis dias e meio) após a ovulação, foram seccionadas com o uso de um equipamento de micromanipulação composto por dois braços, um dos braços possuía uma micropipeta de sucção que mantinha o embrião na posição, o outro braço possuía uma microlâmina, que era posicionada centralmente e dorsalmente ao embrião, e em seguida com um único movimento vertical da lâmina o corte foi realizado. Esse tipo de técnica é conhecido como *splitting*. Vinte hemiembriões e 10 mórulas obtidas nas mesmas condições, foram transferidas inteiras para as éguas receptoras. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na taxa de prenhez entre o grupo de embriões inteiros 70% (7/10) e o grupo de hemiembriões (10/20). Já em relação ao número de embriões de cada grupo, houve diferença ( $p < 0,05$ ) na taxa de prenhez, 70% (7/10) inteiros e 100% (10/10) bipartidos, das 10 gestações obtidas com hemiembriões, oito gestações foram obtidas com o desenvolvimento de apenas um dos hemiembriões, e duas resultantes do mesmo par (SILVEIRA et al., 2005), esses resultados abrem um precedente para o uso de técnicas de biópsia em equinos, com o intuito de determinar o sexo, sem que ocorra queda na taxa de gestação.

A primeira pesquisa bem sucedida com o uso da PCR para determinar o sexo de embriões biopsiados e a viabilidade dos mesmos após a transferência, foi realizada por Huhtinen e colaboradores (1997). Os autores começaram as biópsias dos embriões através de microaspiração. Entretanto, houve grande dificuldade na penetração da cápsula, e os dois embriões onde essa técnica foi utilizada foram seriamente danificados. Por isso, as biópsias passaram a ser realizadas através de microsecção, com microlâmina ligada ao micromanipulador e os embriões foram estabilizados com sulcos produzidos na parte inferior da placa de *Petri*. Nesse experimento foram utilizados 24 embriões (contando com os dois biopsiados por aspiração), todos com idade entre D6 e D7, em estágio de mórula ou blastocisto inicial. O tamanho médio dos embriões no grupo biopsiado foi de 179 $\mu$ m e no grupo controle (sem biópsia) foi de 213 $\mu$ m e não houve diferença estatística entre os tamanhos e estágios dos embriões entre os dois grupos. Quatorze embriões foram biopsiados e o diagnóstico sexual revelou oito fêmeas e seis machos. Após a transferência três (21%) receptoras ficaram gestantes (todos embriões fêmeas), duas gestações chegaram a termo e uma foi abortada. O aborto foi realizado com a aplicação de luprostirol e ocitocina e foi realizada a dilatação manual da cérvix onde o conceito foi conduzido do útero para dentro da vagina, e o embrião foi utilizado para análises citogenéticas. No grupo controle com embriões transferidos inteiros, houve seis gestações e não foram analisadas diferenças entre as taxas de gestação.

Devido às dificuldades associadas com colheitas de embriões no 6<sup>o</sup> dia (McKINNON; SQUIRES, 2007; JACOB et al., 2010), Choi e colaboradores (2010) avaliaram a viabilidade de embriões em estágio de desenvolvimento mais avançado. As biópsias foram realizadas por aspiração com o auxílio do piezo Drill, que é um sistema que emite impulsos elétricos, facilitando a perfuração da cápsula e a aspiração das células trofoblásticas. Os embriões D6 estavam em estágio de mórulas, mórulas tardias ou blastocistos, todos os embriões ainda apresentavam a zona pelúcida. No caso dos blastocistos, a cápsula já podia ser vista, os

embriões apresentavam diâmetro de 159 - 245µm; os embriões D7 eram blastocistos expandidos, com cápsula bem formada, e um pequeno resquício ou ausência de zona pelúcida, variando entre 297 - 611µm; os embriões com idade D8 eram bem maiores apresentando diâmetro entre 790 - 1350µm, e estavam em estágio de blastocisto expandindo, sem evidência de zona pelúcida e cápsula bem formada. As taxas de gestação para D6, D7 e D8, foram de 41,6% (5/12), 83% (10/12) e 75% (3/4), respectivamente. Os resultados demonstram que a violação da cápsula não inviabiliza o desenvolvimento gestacional, e taxas de prenhez satisfatória são obtidas após os procedimentos, diferentemente do que se acreditava em estudos anteriores.

Muitos estudos relatam que o fator determinante para o sucesso da biópsia de embriões e sua posterior viabilidade, envolve principalmente o tamanho do embrião. Entretanto as taxas de gestação não tiveram diferenças significativas para embriões ≤ 300µm foi de 75% (6/8) e de 77,3% (17/22), grupo biopsiado e controle, respectivamente; e para os embriões > 300µm, a taxa de gestação foi de 28,6% (2/7) contra 62,5% (10/16) para o grupo biopsiado e controle, respectivamente (CULLINGFORD, 2010). Os resultados de Herrera e colaboradores (2014), utilizando 150 embriões com diâmetro < 300µm, 300 - 1000µm ou >1000µm, que foram aspirados e as taxas de gestação foram de 33,3% (2/6); 62,3% (43/69); 62,0% (18/29), não diferindo (p > 0,05) em relação a taxa de gestação dos embriões controle (não aspirado) de mesmo diâmetro 44,4% (4/9); 69,6% (16/23), 57,1% (8/14), respectivamente.

Uma metodologia mais recente envolve a aspiração somente do fluido da blastocèle, sem aspirar nenhuma célula embrionária. Treze embriões tiveram o fluido da blastocèle aspirado e foi possível determinar o sexo de 11 (84,6%) desses embriões, sendo oito machos e três fêmeas. Nesse caso os embriões após a aspiração foram cultivados in-vitro e demonstraram sinais de desenvolvimento, mas nenhuma transferência para o útero de éguas foi realizada (HERRERA et al., 2015).

### 2.6.2 Análise do DNA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma tecnologia capaz de viabilizar os procedimentos como identificação do sexo embrionário e diagnóstico de doenças genéticas, investigação de paternidade entre outras análises genéticas (MELO et al., 2012). A grande desvantagem do método é a necessidade de remoção de células do embrião. Entretanto, é um procedimento realizado em poucas horas e tem quase 100% de precisão na identificação do sexo (MANNA et al., 2003).

Mullis e colaboradores (1986) foram os responsáveis pelo desenvolvimento e realização da PCR com especificidade na cópia de segmentos de DNA. A técnica é um procedimento rápido que possibilita a multiplicação de um trecho específico do DNA (todo ou parte do gene, além de sequências extra-gênicas), partindo-se de uma quantidade mínima de DNA alvo (LIMA, 2008).

Os componentes necessários para a amplificação por PCR são: (1) dupla fita de DNA para servir de molde para a replicação desejada; (2) *primers* ou oligonucleotídeos - sequências específicas de aproximadamente 20 pares de bases (pb) complementares à sequência adjacente a da região de DNA alvo; (3) enzima DNA polimerase - é responsável pela polimerização das novas fitas de DNA; (4) dNTPs (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados) - são nucleotídeos livres que serão incorporados pela enzima durante o processo de replicação da sequência alvo; (5) tampão - mantém o pH constante para a atividade da enzima DNA polimerase; e (6) sais (MgCl<sub>2</sub>) - é um doador muito estável de íons Mg<sup>2+</sup>, que são cofatores indispensáveis para a atividade da enzima (VIEIRA, 2002).

Após ciclos repetidos de temperatura, divididos em três etapas: 1<sup>o</sup> - desnaturação das cadeias do DNA em alta temperatura (94 - 96°C), 2<sup>o</sup> - pareamento dos *primers* em posições

específicas (entre 30 – 60°C, definida em função da sequência nucleotídica dos *primers*), 3° - extensão da sequência a ser amplificada pela ação da enzima DNA polimerase (LIMA, 2008), após repetidos ciclos de desnaturação, pareamento dos *primers* e extensão da sequência alvo, ocorre uma multiplicação exponencial de cópias da sequência alvo a partir da amostra inicial (ERLICH et al., 1991). No início dos estudos com PCR, o uso de temperaturas elevadas na etapa de desnaturação inativava a enzima DNA polimerase, sendo essa recolocada a cada novo ciclo de desnaturação, o que dispndia muito tempo e trabalho. Esse procedimento foi eliminado com a introdução de uma enzima DNA polimerase termoestável, denominada *Taq* DNA polimerase, isolada de uma bactéria termófila conhecida como *Thermus aquaticus* (BROCK; FREEZE, 1969). A *Taq* DNA polimerase, não sofre inativação em temperaturas elevadas, dessa forma os ciclos da PCR não precisam ser interrompidos, e ela ainda aumentou a especificidade e rendimento da reação de amplificação (SAIKI et al., 1988).

O produto resultante da PCR, tipicamente é identificado através da separação por eletroforese, em gel de poliacrilamida ou agarose imerso em uma solução tampão. Ao imprimir uma carga elétrica, os eletrólitos presentes no tampão também empregados no preparo do gel, geram uma corrente elétrica que faz com que o DNA migre através da matriz (gel), cuja velocidade está relacionada à concentração do gel, a voltagem e ao tamanho do fragmento. Desse modo os fragmentos maiores terão mais dificuldade para atravessar a matriz e se deslocarão menos, ao passo que os fragmentos menores amplificados migrarão para mais longe do local onde os produtos foram inoculados no gel. A visualização é feita ao corar o gel o que varia de acordo com o tipo, se de agarose ou poliacrilamida (BARTLETT; STIRLING, 2003).

A utilização da PCR para identificação do sexo já foi utilizada em humanos (MARTINHAGO, 2007), ovinos (MARA et al., 2004; SANTOS JUNIOR et al., 2011), búfalos (MANNA et al., 2003) e já faz parte da rotina na produção de embriões bovinos (CARVALHAIS et al., 2005; RUFINO et al., 2006; LOPATAROVA et al., 2010).

A metodologia para identificação do sexo normalmente se baseia na presença ou ausência da amplificação de genes ligados ao cromossomo Y, sendo o mais frequente o gene *SRY*. Outra abordagem é a amplificação do gene *ZFY* (*Zinc Finger Protein Y-Linked*)– *ZFX* (*Zinc Finger Protein X-Linked*), que estão ligados aos cromossomos sexuais Y-X, respectivamente (PEIPPO et al., 1995).

Em equinos, o primeiro grupo a identificar o sexo de embriões foi Peippo e colaboradores (1995). Dezesete blastocistos equinos foram seccionados em três a sete partes e o sexo foi confirmado usando um par de *primers* *ZFX/ZFY* anteriormente utilizado para a identificação do sexo em ratos, seguido do uso de enzima de restrição para demonstrar o polimorfismo entre as sequências homólogas. Os resultados demonstraram uma eficiência de 95%, onde oito embriões foram identificados como fêmeas e nove como machos. Não houve divergência em relação ao sexo para as diversas “partes” de um mesmo embrião. Entretanto, para algumas dessas “partes” não foi possível confirmar o sexo, e os autores argumentam que a biópsia pode ter sido perdida durante a manipulação.

Han e colaboradores (2010), utilizando amostras sanguíneas equinas e um conjunto de *primers* para amplificação do intron 9 dos genes *ZFX/ZFY* demonstraram a existência de um dimorfismo sexual com base em uma diferença de 51 pares de base (pb) entre os genes ligados aos cromossomos X e Y. O sangue proveniente de potros (machos) apresentavam duas bandas (553 e 604pb) e as éguas (fêmeas) possuíam uma única banda (604pb). Concluiu-se que a banda compartilhada por fêmeas e machos, foi amplificada a partir do gene ligado ao cromossomo X, enquanto a outra banda amplificada apenas nas amostras de machos era proveniente do cromossomo Y. Além disso, as amostras com duas bandas foram as únicas que também apresentaram banda com o uso de *primer* para amplificação de uma região do gene *SRY*, que é específico do cromossomo Y, presente nos machos.

A utilização de um PCR duplex (utilizando dois conjuntos de iniciadores) para amplificação dos genes *ZFX/ZFY* (445pb) e do gene *SRY* (127pb; 121pb) não obteve resultado satisfatório, onde a identificação do sexo foi de apenas 30% (11/37) das amostras sendo 55% (6/11) do sexo masculino e 45% (5/11) do sexo feminino. Como indicado pelos próprios autores, o resultado ruim provavelmente decorreu da perda de células durante a transferência das células submetidas à biópsia para os tubos plásticos do tipo *ependorf*. A primeira hipótese de falta de sensibilidade do teste foi descartada, uma vez que uma amostra, onde se conhecia a concentração de DNA foi diluída até se chegar a concentração de apenas uma célula e nesse caso a eficácia de determinação do sexo foi de 100% (CULLINGFORD, 2010).

Herrera e colaboradores (2014), também identificaram o sexo de embriões equinos, através de um PCR duplex para amplificação dos genes *SRY* (equino) e amelogenina (*AMEL*), esse último está localizado nos cromossomos sexuais X e Y, entretanto a região codificadora deste gene no cromossomo Y é mais curta do que no cromossomo X. No caso das fêmeas, os resultados indicavam a presença de apenas uma banda de 184pb, que corresponde ao gene *AMEL-X*, e nos machos, duas bandas correspondem ao *AMEL-Y/AMEL-X* (184pb e 200pb), além de uma banda com 429pb amplificada a partir do gene *SRY*. Das 104 amostras, foi possível identificar o sexo em 52. Outras 17 amostras apresentaram algum produto de amplificação inespecífico. Das 52 amostras, 32 foram identificadas como fêmeas e 20 machos, entretanto, a ultrassonografia foi utilizada para confirmação dos resultados, e apenas 27 das 32 amostras eram realmente fêmeas, as outras 5 eram machos. Isso demonstra uma coincidência na determinação do sexo de 84,3% para as fêmeas e 100% para os machos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRRJ sob o número 23083.010030/2012-07.

#### 3.1 Período e Local de Execução

As colheitas de embriões e avaliações relacionadas com a transferência de embriões foram desenvolvidas durante o período correspondente às estações de monta (setembro a março) de 2012/2013 e 2013/2014 e em seguida, nos meses fora da estação de monta, foram realizadas as análises moleculares. A parte da pesquisa que envolveu diretamente o trabalho com os animais - transferência de embriões, foi desenvolvida no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal e no Setor de Equideocultura do Instituto de Zootecnia, e os procedimentos de análise molecular foram realizados no Departamento de Genética vinculado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, situada no município de Seropédica- RJ.

#### 3.2 Transferência de Embriões (TE)

##### 3.2.1 Animais

Foram utilizadas 67 éguas, entre doadoras e receptoras de embriões, 13 éguas foram usadas como doadoras e receptoras, as características referentes a categoria, raça, número de animais e idade estão descritas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Características relacionadas à categoria, raça, número de animais e idade das éguas utilizadas no experimento.

CATEGORIA	RAÇA	Nº DE ANIMAIS	IDADE
Doadoras	Bretão Postier	7	7-12 anos
	Mangalarga Marchador	33	3-15 anos
	Mestiça Mangalarga	18	4-12 anos
Receptoras	Mangalarga Marchador	13	5-12 anos
	Mestiça Mangalarga	9	3-7 anos

Todas as éguas apresentavam boa condição corporal com escore mínimo de cinco (escala de classificação de um a nove) (HENNEKE et al., 1983), com ciclos estrais regulares e histórico reprodutivo conhecido. As éguas passavam a maior parte do tempo soltas a pasto, formados por capim *Panicum maximum* (Tanzânia) e com água fresca *ad libitum*, e eram confinadas em piquete somente na parte da manhã, para execução dos procedimentos reprodutivos e para suplementação alimentar com 2,0 kg de concentrado diariamente.

Como garanhão foi utilizado um único jumento da raça Pêga, que passou por um exame andrológico prévio, e com fertilidade comprovada. O animal apresentava boa condição corporal, era mantido em baia fechada a maior parte do tempo, com alimentação diária a base de feno de alfafa, 3,0 Kg de concentrado ou ração comercial a 12% de proteína e água fresca *ad libitum*, o animal era solto e exercitado em piquete durante um período do dia.



### 3.2.2 Controle do ciclo estral

Foi realizado o acompanhamento de 127 ciclos estrais das éguas doadoras, no caso das éguas receptoras foi realizado o acompanhamento do ciclo estral somente para sincronização das mesmas com as éguas doadoras.

A atividade ovariana das éguas foi monitorada por meio da palpação retal e técnica de ultrassonografia, com aparelho modelo Mindray DP2200Vet, equipado com transdutor linear de 5.0MHz. As avaliações foram realizadas a cada dois ou três dias até a observação de um folículo  $\geq 23$ mm, quando passaram a ser avaliadas diariamente até a detecção de um folículo  $> 30$  mm e presença de edema uterino na escala de um a quatro (McKINNO; SQUIRES, 1988), momento em que foi realizada a indução da ovulação.

A indução da ovulação foi realizada em todos os ciclos estrais utilizando três diferentes agentes indutores: H1 (n = 75) – tratamento com 1000UI (1,0 mL i.v.) de hCG (Chorulon<sup>®</sup> - Intervet Schering-Plough Animal Health), H2 (n = 39) – tratamento com 715UI (0,715 mL i.v.) de hCG (Chorulon<sup>®</sup> - Intervet Schering-Plough Animal Health) e H3 (n=13) – tratamento com 750 $\mu$ g (3,0 mL i.v.) de Acetato de Deslorelina (Sincrorrelin<sup>®</sup> - Ourofino Saúde Animal). Após a indução da ovulação, o monitoramento da atividade ovariana foi realizado uma vez ao dia até a detecção da ovulação.

### 3.2.3 Inseminação artificial (IA)

As éguas doadoras foram inseminadas, por via transcervical, com deposição do sêmen no corpo do útero. A inseminação foi realizada 24 horas após a indução da ovulação, e nos casos onde não ocorreu a ovulação, a inseminação foi repetida com 48 horas decorridas da primeira inseminação artificial.

Foi utilizado sêmen resfriado, diluído (Botu-Sêmen<sup>®</sup> - Botupharma) na dose de 500 milhões de espermatozoides com movimento progressivo, vigor entre três – cinco (escala de um - cinco), e volume inseminante entre 15 – 30 mL.

### 3.2.4 Colheita dos embriões

Os lavados uterinos para colheitas dos embriões foram realizados sempre pelo mesmo técnico entre os dias seis e nove após a ovulação, como segue nos seguintes grupos: D6 (n = 49) – coletas seis dias após a ovulação, D7 (n = 49) – colheitas sete dias após a ovulação, D8 (n = 24) – colheitas oito dias após a ovulação, D9 (n = 5) – colheitas nove dias após a ovulação.

Para o procedimento as éguas foram contidas em um brete, onde foi realizado o esvaziamento do reto e higienização da genitália externa. Em seguida, um cateter tipo *Folley* (Pets-inc<sup>®</sup>) foi introduzido, por via vaginal, através da cérvix até o corpo do útero, local onde foi inflado o *Cuff* com 40 a 60 mL de ar. Em seguida a sonda foi tracionada em sentido caudal para que o *Cuff* se ajustasse ao óstio cranial da cérvix, obstruindo assim sua abertura. Uma vez a sonda inserida no corpo do útero, foi infundido um litro de solução Ringer com Lactato pré-aquecida a cerca de 37°C. O líquido foi imediatamente drenado em um copo coletor com filtro milipore (com malha de 75 $\mu$ m – apropriado para reter o embrião). Nos casos em que o embrião foi visualizado no copo coletor o restante da solução contida no útero foi drenada e a colheita encerrada. Caso o embrião não tivesse sido encontrado no primeiro lavado uterino, prosseguia-se com a colheita até terem sido realizados três lavados com um litro de solução de Ringer com Lactato cada, nos procedimentos em que o fluido retornou límpido e cristalino, o mesmo litro foi reutilizado nos três lavados de uma mesma égua. Após a infusão do fluido o útero da égua foi massageado vigorosamente através do reto com o intuito de suspender os embriões que podiam estar “apoiados” no endométrio. Após a drenagem de todo o líquido infundido, o ar do *Cuff* foi retirado e o cateter removido do útero.

Ao final do lavado, o fluido contido no filtro de colheita (aproximadamente 50mL) foi rotacionado e vertido em uma placa de *Petri* riscada e descartável de 100 x 20mm. A placa foi levada ao microscópio estereoscópio modelo Tecnival CGA-6745, com aumento de 10x – 20x, para o rastreamento do embrião que, quando localizado, seguia-se ao procedimento de avaliação morfológica do embrião, seguido de secção e transferência dos embriões. O rastreamento foi realizado sempre pelo menos técnico, de forma minuciosa e criteriosa, especialmente nas colheitas realizadas em D6, para que os embriões pequenos não deixassem de ser identificados.

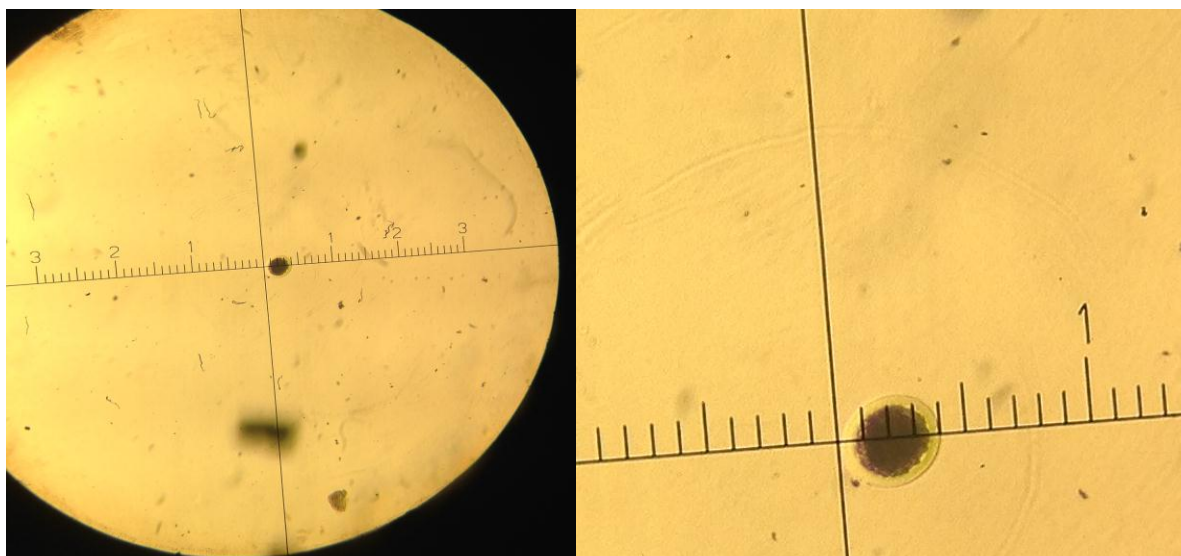
Após a colheita do embrião, a égua doadora recebeu uma aplicação intramuscular de 7,5 mg de Dinoprost Trometamina - PGF2 $\alpha$  (Lutalyse® - Zoetis-Pfizer) para encurtamento do diestro.

### 3.2.5 Avaliação dos embriões

Após a identificação do embrião, o mesmo foi transferido para uma outra placa de *Petri*, onde foi submetido a lavagem para retirada dos debris celulares e possíveis contaminantes do útero, essa lavagem foi realizada em passagens sequenciais do embrião em 10 gotas de meio próprio para embriões – Holding Plus (Vitrocell® - Embriolife).

Com o embrião “limpo”, uma ocular de 10x, com retículo micrométrico foi acoplada ao microscópio estereoscópico (Tecnival CGA-6745), para que o técnico (o mesmo que realizou as colheitas e identificação do embrião) pudesse verificar o diâmetro dos embriões e realizar as demais avaliações. Foi padronizado que a avaliação dos embriões, independente do dia da colheita (D6 – D9) fosse feita sob o maior aumento permitido pelo equipamento, após a mensuração os valores foram transformados segundo a fórmula fornecida pelo fabricante:  $TEm = NDC \times 0,19 / (AO \times ASZ)$ , onde TEm = Tamanho do embrião que deseja determinar; NDC = número de divisões; AO = Ampliação da objetiva; e ASZ = Ampliação do sistema de zoom (Figura 3).

Após a mensuração foi realizada a classificação dos embriões em relação ao estágio (MO, BI, BL e BX) e qualidade embrionária (grau I a IV), como descrito por McKinnon e Squires (1988).



**Figura 3.** Visualização do sistema de retículo micrométrico utilizado para mensuração dos embriões (A); Zoom utilizado como padrão para mensurar o tamanho dos embriões (B).

Encerrado os procedimentos de avaliação dos embriões, os mesmos foram destinados para secção e a análise molecular, alguns embriões após serem seccionados foram transferidos para as éguas receptoras.

### 3.2.6 Preparação dos embriões para identificação do sexo

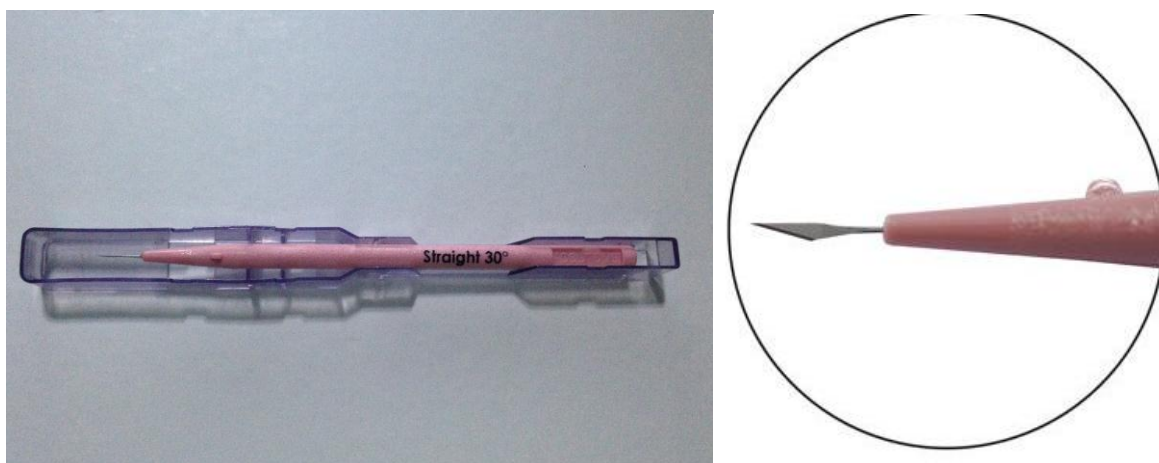
Após a manipulação e avaliação 71 embriões foram preparados para a identificação do sexo, sendo que 39 embriões foram utilizados inteiros, com o intuito de verificar a eficiência de um conjunto de primers utilizado para equinos, na sexagem de embriões muares e 32 embriões foram seccionados (cortados), estes possibilitaram verificar a viabilidade da gestação após o corte, e também se a eficiência da técnica de sexagem com apenas uma pequena porção do embrião.

Os embriões inteiros foram imediatamente transferidos da placa de *Petri* para tubos do tipo *ependorf* de 0,2mL, estes tubos eram novos e foram previamente autoclavados, todos foram identificados com o nome da égua, código do embrião e data da colheita. Para a transferência da placa para os tubos, os embriões menores (D6 e D7) foram transferidos utilizando uma pipeta automática, onde se aspirou o embrião + 1 $\mu$ L do meio próprio de embriões - Holding Plus (Vitrocell<sup>®</sup> - Embriolife).; Já os embriões maiores (D8 e D9) foram aspirados da placa de *Petri* e colocados nos tubos, com o auxílio de uma palheta de manipulação de embriões (0,25 – 0,5mL), e neste caso foi aspirado a menor quantidade possível de meio próprio para embriões.

Antes de iniciar o procedimento de secção dos embriões, eles foram transferidos da placa de *Petri*, onde tinham sido lavados, para uma placa de *Petri* menor (35 x 10mm), contendo 2mL do mesmo meio próprio utilizado na lavagem (Holding Plus).

Para seccionar os embriões, optou-se por adaptar uma técnica simples, de baixo custo e que pudesse ser reproduzida a campo, para tanto a secção foi realizada com a utilização de uma lâmina de bisturi oftálmico (Accusharp 30G - ACCUTOME<sup>®</sup>) (Figura 4).

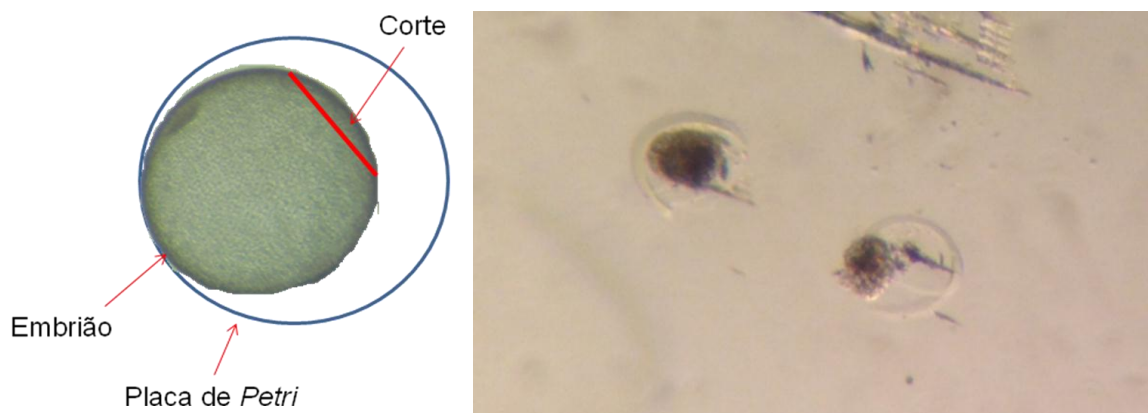
O embrião foi posicionado próximo a lateral da placa, para que no momento da secção ele não “movimentasse”. Com a visualização do embrião através da lupa, a lâmina de bisturi oftálmico foi posicionada bem em cima do embrião, um pouco deslocado do centro do embrião, com a intenção de produzir dois hemi-embriões com tamanhos desiguais (um menor e outro maior).



**Figura 4.** Lâmina de bisturi oftalmológico utilizada para seccionar os embriões (A); Detalhe lâmina de bisturi oftalmológico (B).

Após o posicionamento da lâmina, foi feito o corte com um único movimento que teve início com a ponta da lâmina, na borda do embrião e em seguida o restante da lâmina foi

pressionada contra o embrião (Figura 5A), a lâmina foi então deslocada para a lateral para “soltar” as duas metades (Figura 5B).



**Figura 5.** Esquema de posicionamento e corte do embrião (A); Duas porções do embrião híbrido após o corte, onde a menor foi utilizada para a identificação do sexo e a maior parte para a transferência para o útero das éguas receptoras (B).

Após a secção, nove embriões tiveram as duas metades utilizadas separadamente para a identificação do sexo. Os outros 23 embriões, a maior metade oriunda do corte foi transferida para o útero das éguas receptoras e a metade menor foi utilizada para a identificação do sexo. No caso dos embriões seccionados, os mesmos foram transferidos para tubos do tipo *ependorf*, da mesma maneira como foi feito para os embriões inteiros.

Os tubos de *ependorf* foram acondicionados em caixa de isopor e levados imediatamente para o laboratório para extração do DNA.

### 3.2.7 Transferência dos embriões seccionados

Vinte e três embriões seccionados foram transferidos para o útero de receptoras previamente sincronizadas com as éguas doadoras. Todas as éguas receptoras tinham entre três e cinco dias pós-ovulação, e as mesmas foram avaliadas previamente antes da transferência para verificar as características uterinas, cérvix firme e fechada, aumento de tônus (cilíndrico e tubular), ausência de evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico, e outros distúrbios incompatíveis com a transferência.

Para a transferência foi utilizada a maior porção proveniente da secção dos embriões, essa porção foi acondicionada em pipetas de IA, na seguinte ordem: meio de embrião, ar, meio + maior porção do embrião, ar e meio. A pipeta de IA foi protegida com camisa sanitária e esse conjunto foi utilizado para depositar o embrião no útero da égua receptora.

Para o procedimento de transferência a receptora foi contida em tronco, a cauda amarrada, o reto esvaziado e a genitália higienizada, da mesma maneira como foi realizado com a égua doadora para a colheita dos embriões. A mão contendo a pipeta de IA foi introduzida pela vagina, depois cérvix, uma vez na cérvix, a camisa sanitária foi puxada para trás, enquanto a pipeta foi mantida no lugar, dessa maneira, apenas a pipeta foi inserida no lúmen uterino. Com a pipeta devidamente posicionada no corpo do útero, o embrião foi depositado.

O diagnóstico de gestação das receptoras foi realizado aos 15 dias (contados da ovulação da doadora), e repetida aos 30 dias de gestação para avaliar a perda embrionária precoce (PEP).

### 3.3 Análise Molecular

#### 3.3.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA, 9µL de tampão de reação 10X (Biotools<sup>®</sup>, B&M Labs) e 150µg de proteinase K, foram acrescentados aos tubos do tipo *ependorf* de 0,2mL, que continham o embrião (ou parte dele), além do meio próprio de embriões - Holding Plus (*Vitrocell<sup>®</sup>-Embriolife*). Em seguida os tubos foram colocados em um termociclador (*Biotraza, LongGene<sup>®</sup>*, Modelo MG96+), sob as seguintes condições: 37°C por 1 hora, seguido de 98°C por 8 minutos (HUHTINEN et al, 1997).

Após a lise celular para extração do DNA, os tubos foram congelados a - 20°C, para conservação das amostras até que fosse realizada a PCR. Não foi realizada a quantificação do DNA extraído dos embriões inteiros ou a porção resultante do corte.

#### 3.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a determinação do sexo, foi realizada a PCR convencional multiplex, utilizando os *primers SRY* e *ZFX/ZFY* (CULLINGFORD, 2010) (Quadro 4).

**Quadro 4.** Sequência dos *primers* (*Foward* – F e *Reverse* – R) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados para a identificação do sexo dos embriões.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho
<i>ZFX/ZFY</i> – F	5'– ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT – 3'	445pb
<i>ZFX/ZFY</i> – R	5'– GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT – 3'	
<i>SRY</i> – F	5 – ACAAACGGGAGGAGCGGTTA – 3'	217pb
<i>SRY</i> – R	5' – CAGGGACTCTGAAGCCACCA – 3'	

Para a amplificação dos fragmentos de interesse foi utilizado o *Master Mix GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase* (Promega, Madison, WI). O volume final das reações foi de 25µL compostas por 5µL de *Green GoTaq Reaction Buffer* (5X), 1µL de cada *primer ZFX/ZFY*–F/R a 10µM, 1 µL de cada *primer SRY*–F/R a 10µM, 0,5µL de dNTP mix (Promega, Madison, WI) a 10 mM cada, 0,12µL de *GoTaq DNA polymerase* (5U/µL) (Promega, Madison, WI), 2 µL de DNA extraído dos embriões, completando o volume com 13µL de água ultra-pura/*nuclease free-water* (Promega, Madison, WI). Em alguns casos foi necessário alterar os volumes de DNA ou até mesmo dos *primers*, e nestes casos o volume de água foi modificado para manter os 25µL do volume final de reação.

Além das reações contendo o DNA dos embriões em todas as amplificações foram incluídos dois controles positivos, onde foi utilizado o DNA extraído do sangue de uma égua (controle positivo de fêmea) e do sangue de um jumento (controle positivo de macho), e também um controle negativo, onde ao invés de DNA foi adicionado água ultra-pura para verificar a contaminação dos reagentes.

Após o preparo, as reações foram colocadas no termociclador, para amplificação segundo o seguinte ciclo de temperaturas: primeiro passo a 95°C por dois minutos (desnaturação), seguido de 40 ciclos de 95°C por 45 segundos (desnaturação da dupla fita de DNA), 62°C por 45 segundos (anelamento dos *primers*) e 72°C por um minuto (extensão do fragmento), após a repetição de todos os ciclos, a finalização da reação ocorreu a 72°C por nove minutos.

#### 3.3.3 Identificação dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, para a migração e separação dos fragmentos no gel. A eletroforese ocorreu a 120 – 130 Volts,

por cerca de uma hora. Em todos os géis, na primeira canaleta foi incluído o *DNA Ladder*, padrão de peso molecular de 50 ou 100pb, seguido pelas amostras nas demais canaletas, e nas últimas canaletas foram aplicados os controles negativo e positivos. Para análise dos produtos de PCR, o gel permaneceu por 10 minutos em solução fixadora, composta por: 25mL de etanol comercial + 1,25mL de ácido acético + 225mL de H<sub>2</sub>O destilada. Em seguida foi corado por 10 minutos (SOB agitação constante) em solução de Nitrato de Prata (AgNO<sub>3</sub>) a 0,2%, e após essa etapa, foi realizada a revelação com solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 3% acrescido de 0,6% de formol, onde o gel foi agitado imerso na solução até o aparecimento das bandas. Após a revelação o gel foi imerso por mais 10 minutos na solução inicial utilizada para fixação, com o intuito de interromper a revelação. Depois de corado, os géis foram fotografados no transiluminador (L-PIX<sup>®</sup>, Loccus biotecnologia), para posterior avaliação dos resultados.

### **3.4 Análise Estatística**

O tamanho dos folículos no momento do tratamento verificado através da análise de variância - ANOVA. Os dados referentes a taxa de ovulação, recuperação embrionária nos diferentes dias e eficácia da identificação do sexo em embriões inteiros e seccionados foi determinada através do teste Exato de Fisher, com 5% de significância estatística. O teste do Qui-Quadrado ( $X^2$ ), foi utilizado para verificar se houve influencia da raça das éguas doadoras de embriões. Para verificar o crescimento dos embriões foi utilizada a regressão linear simples. O teste binominal foi utilizado para verificar se a proporção de embriões identificados como machos ou fêmeas diferiu do conceito de equilíbrio onde se espera 50% de embriões machos e 50% de fêmeas.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evidências sugerem que o momento ideal para o tratamento com agentes indutores da ovulação, deve ser realizado na presença de um folículo ovariano  $\geq 35\text{mm}$  associado a presença de edema uterino. No presente estudo o diâmetro médio dos folículos no momento da indução foi de  $38,5 \pm 4,18\text{mm}$  com edema uterino entre três e quatro (escala de um – quatro), algumas induções foram realizadas com folículos ovarianos de diâmetro menor que  $35\text{mm}$ , mas nunca menor que  $30\text{mm}$ , essas induções foram necessárias em função da sincronização com as receptoras e também com a disponibilidade do sêmen, uma vez que as coletas de sêmen eram realizadas apenas em dias alternados.

O diâmetro dos folículos no dia do tratamento não diferiu entre os três grupos ( $p > 0,05$ ), e as médias foram  $39,2\text{mm}$  para o grupo tratado com  $1000\text{UI}$  de hCG (H1),  $37,9\text{mm}$  para os ciclos tratados com  $715\text{UI}$  de hCG (H2) e  $37,4\text{mm}$  para o grupo tratado  $750\mu\text{g}$  de Acetato de Deslorelina (H3) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de ciclos, média e desvio padrão do tamanho do folículo no momento do tratamento, e percentual de éguas ovuladas com os diferentes agentes indutores da ovulação.

Tratamento	Ciclos	Tamanho do folículo (mm)	% de ovulações
1000UI hCG (H1)	75	$39,2 \pm 4,3$	85,3%
715UI hCG (H2)	39	$37,9 \pm 4,0$	74,4%
750 $\mu\text{g}$ Deslorelina (H3)	13	$37,4 \pm 3,7$	69,2%

( $p > 0,05$ )

A ovulação aconteceu em até 48 horas em 80,3% (102/127) das induções realizadas. Esse resultado corrobora com os resultados já descritos por outros autores que afirmam que se a indução da ovulação for realizada no momento adequado, a maioria das éguas irá ovular em até 48 horas após a aplicação dos hormônios (PALMER, 1993; SAMPER, 1997, BERGFELT, 2000; BRINSKO et al., 2000; LeBLANC, 2006; GINTHER et al., 2008; PYCOCK, 2008; SAMPER, 2008; JACOB et al., 2011).

O percentual de ciclos onde ocorreu a ovulação após 48 horas da aplicação dos fármacos, foi de 85,3% (64/76), 74,4% (29/39) e 69,2% (9/13), para os grupos H1, H2 e H3, respectivamente. Houve apenas um ciclo com dois folículos dominantes, e onde ocorreu dupla ovulação. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes grupos experimentais.

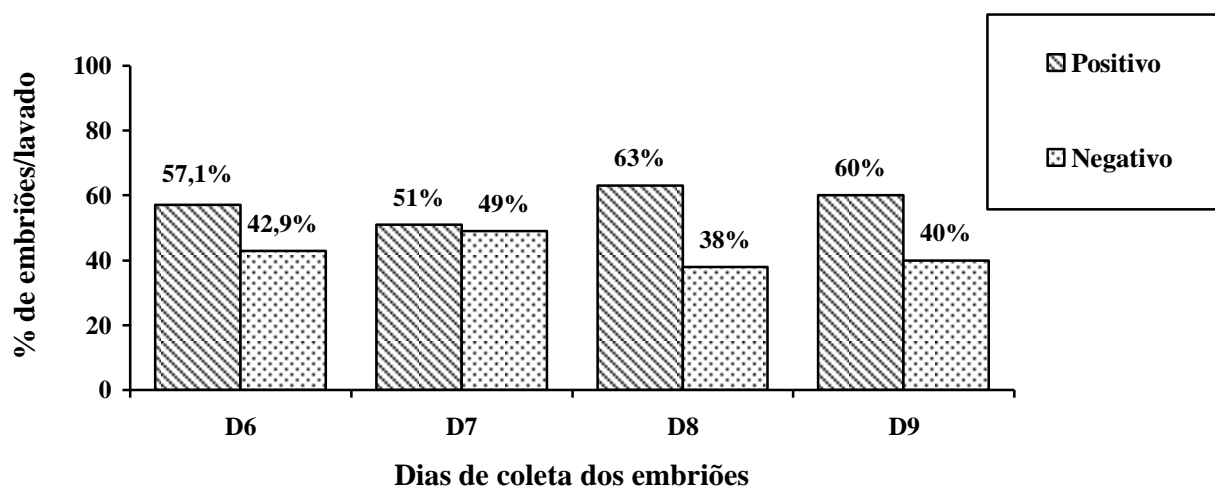
No estudo de Sieme e colaboradores (2003), o percentual de éguas ovuladas em 48 horas após a indução foi de 97,5%, entretanto, a dose utilizada por esses autores foi de  $1500\text{UI}$  de hCG (superior as doses utilizadas no presente estudo) e no momento da indução os folículos apresentavam diâmetro superior ( $40\text{mm}$ ) ao diâmetro de indução do presente. Camillo e colaboradores (2004) induziram a ovulação com folículos maiores que  $32\text{mm}$ , ou seja abaixo do preconizado, entretanto, utilizaram uma dose de hCG superior ( $2500\text{UI}$ ), as doses utilizadas no presente estudo ( $750$  e  $1000\text{UI}$ ), o que justificaria o maior percentual de éguas ovuladas – 97,6% em até 48 horas. Essas evidências nos faz sugerir, que o uso de doses muito baixas de hCG, podem diminuir o percentual de éguas ovuladas em até 48 horas da aplicação.

A indução com o uso da Deslorelina, não demonstrou diferença em relação aos grupos tratados com a hCG. Porém outros estudos revelam um percentual elevado de ovulação após a utilização da deslorelina, como nos achados de Maio e colaboradores (2010), onde a taxa de ovulação após o uso de  $750\mu\text{g}$  de Deslorelina foi de 88,9% (32/36), entretanto os autores desse estudo indicam que o acompanhamento para detecção da ovulação foi realizado até 72h

após a indução, e dessa forma não fica claro se a taxa de ovulação foi em até 48h ou em até 72h, o que justificaria um maior percentual de éguas ovuladas após um maior tempo entre a indução e a ovulação. Já Silva (2011) reportou uma taxa de 90% (27/30) de ovulações em até 48 horas após a aplicação da Deslorelina, contudo a Deslorelina utilizada no presente estudo e no estudo referenciado, pertenciam a laboratórios diferentes, podendo ser este o fator diferencial.

Em equinos, o lavado para colheita de embriões, é realizado entre os dias seis e nove após a ovulação, porém os dias sete e oito apresentam uma taxa de recuperação superior, em comparação com o dia seis, e as colheitas nove dias após a ovulação, apresentam taxa de recuperação semelhante aos dias sete e oito, entretanto, as taxas de prenhez com embriões D9, são inferiores as taxas dos demais dias (SQUIRES; SEIDEL, 1995). No presente estudo, a taxa de recuperação embrionária foi de 55,9% (71/127), os lavados para colheita de embriões provenientes do cruzamento de éguas com jumentos, foram realizados nos dias 6, 7, 8 e 9 após a ovulação e as taxas de recuperação embrionária para os diferentes dias foi: 57,1% (28/49), 51% (25/49), 63% (15/24), 60% (3/5), respectivamente e não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre a taxa de recuperação embrionária para os diferentes dias de colheita (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Taxa de recuperação embrionária nos diferentes dias de colheita de embriões híbridos.



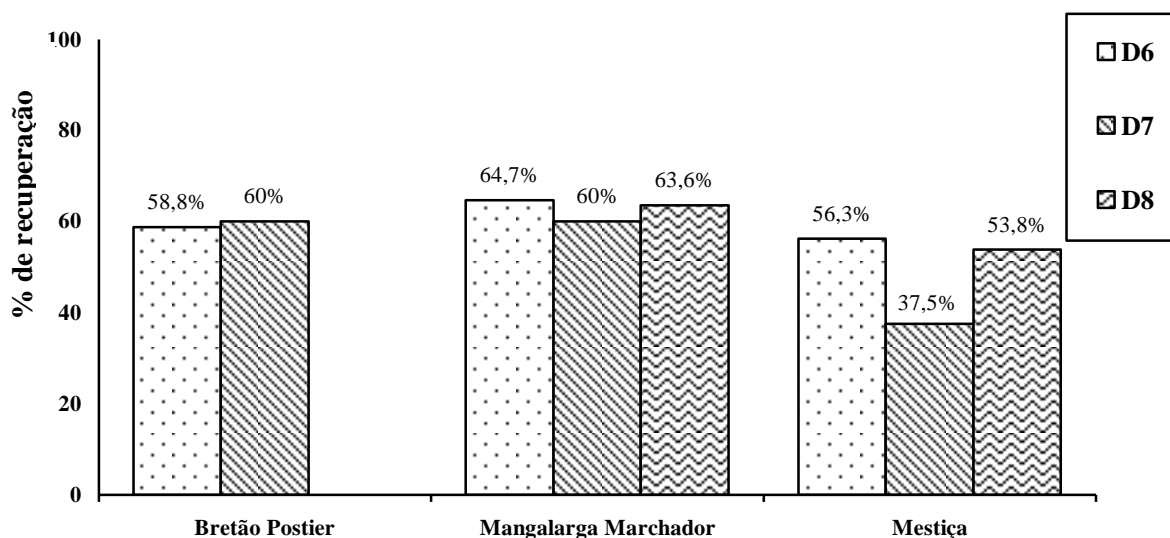
Em equinos foi observada uma menor taxa de recuperação embrionária no D6. No estudo de Jacob e colaboradores (2010) a taxa de recuperação embrionária no D6 - 42% (16/38), diferiu ( $p < 0,03$ ), das taxas de recuperação embrionária no D7 - 61%, (159/262), D8 - 66% (285/434), D9 - 59% (39,66) e D10 - 56% (09/05). O mesmo foi observado no experimento de Camargo e colaboradores (2013), onde a taxa de recuperação embrionária no D6(18,1% - 2/11) e D10 (35,3% - 6/17) foram menores ( $p < 0,01$ ), que as taxas observadas em D7 (56% - 14/25), D8 (64,5% - 189/293), e D9. (52,6% - 181/344). Camillo e colaboradores (2010), também observaram diferenças na taxa de recuperação de embriões de jumentas, com uma menor taxa ( $p < 0,05$ ) de recuperação para o D7 - 12,5% (1/8) em relação aos dias 8 e 9, 79,1% (43/58) e 75% (12/26), respectivamente.

Os estudos realizados por Jacob e colaboradores (2010), Camargo e colaboradores (2013) e Camillo e colaboradores (2010), foram realizados com doadoras Mangalarga Marchador, Brasileiro de Hipismo e Jumentas, respectivamente. E todos eles demonstraram haver diferença na taxa de recuperação embrionária de embriões mais jovens *versus* embriões mais velhos.



No presente estudo apesar da utilização de doadoras de diferentes raças (Bretão Postier, Mangalarga Marchador e Mestiça), a taxa de recuperação embrionária total e entre os diferentes dias de colheita não diferiu entre as raças ( $p > 0,05$ ). A taxa de recuperação embrionária total foi de 59,1% (13/22), 63,5% (33/52) e 47,2% (25/53), respectivamente. A taxa de recuperação embrionária para os diferentes dias de colheita de acordo com cada uma das raças estão apresentadas no Gráfico 2. Poucas colheitas foram realizadas em D9, pois os embriões recuperados eram muito grandes, e dessa maneira eram indesejados para a realização da secção, dessa maneira o baixo número amostral não permitiu que fosse realizada a análise estatística em relação as diferentes raças das doadoras.

**Gráfico 2.** Taxa de recuperação embrionária em D6, D7 e D8, para as diferentes raças das doadoras.



Os resultados semelhantes na taxa de recuperação embrionária em D6 em relação aos demais dias obtido no presente estudo são satisfatórios especialmente para associar a TE com outras biotecnologias da reprodução, como a sexagem ou o congelamento de embriões que apresentam melhores resultados com embriões mais jovens.

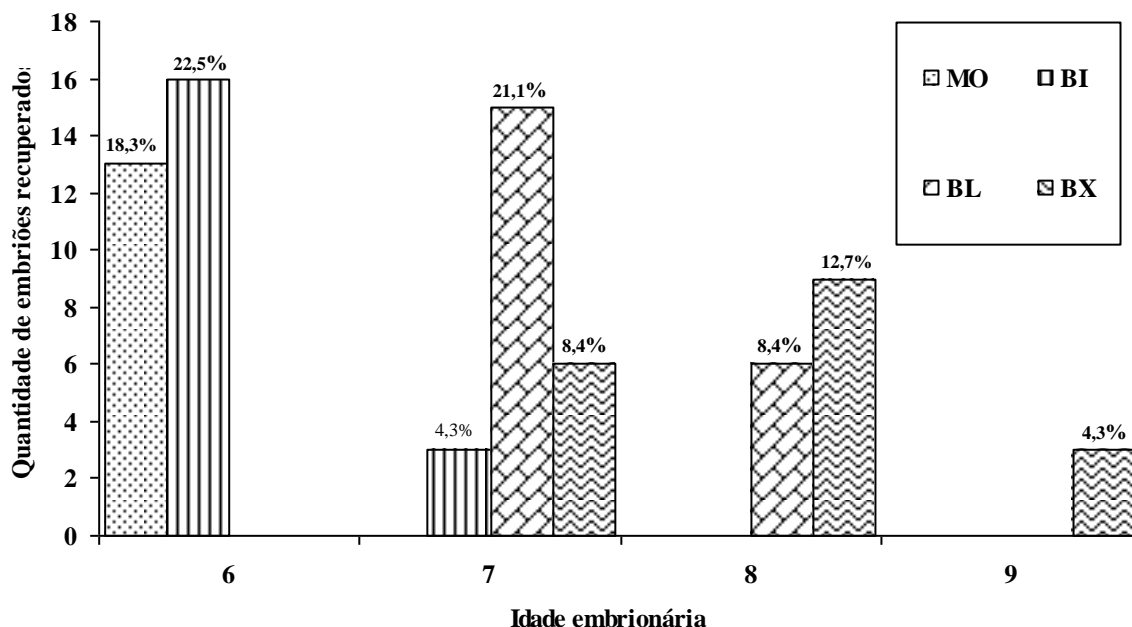
McKinnon e Squires (2007) relataram que uma das causas da taxa de recuperação embrionária ser inferior no D6 em relação aos outros dias é a não descida do embrião para o útero no dia seis, o que não ocorreu no presente estudo, uma vez que a taxa de recuperação embrionária não diferiu entre D6, D7, D8 e D9. Esse resultado sugere que os embriões híbridos podem sair da tuba uterina em direção ao útero antes do dia 5,5 e 6 como se conhece para os embriões equinos, dessa forma novos estudos devem ser realizados para verificar essa característica, que pode ser um grande diferencial no uso das biotecnologias para a produção de muare.

Conforme o dia em que se realizam os lavados, espera-se recolher embriões no estágio de desenvolvimento correspondente com a idade (dia do lavado), segundo McKinnon e Squires (1988), nas colheitas realizadas seis a oito dias após a ovulação, são encontrados quatro diferentes estágios embrionários, sendo: MO - mórula (embrião de seis dias), BI - blastocisto inicial (embriões de seis a sete dias), BL - blastocisto (embriões de sete dias) e BX - blastocisto expandido (embriões de oito dias), entretanto os embriões podem ser recuperados, em estágios diferente do esperado, em grande parte das vezes isso acontece, ou por fatores fisiológicos, como no caso de éguas idosas, onde ocorre um atraso no desenvolvimento, ou por falhas na detecção da ovulação. No presente estudo foram identificados os quatro estágios embrionários, sendo mórula: 18,3% (13/71); blastocisto

inicial: 26,8% (19/71); blastocisto: 29,6% (21/71); e blastocisto expandido: 25,3% (18/71). Além dos embriões, em um dos ciclos foi recuperado um oócito.

Os embriões híbridos recuperados nos dias 6, 7, 8 e 9 pós-ovulação, apresentavam-se em diferentes estágios de desenvolvimento para um mesmo dia de colheita (Gráfico 3).

**Gráfico 3.** Embriões híbridos recuperados no D6, D7, D8 e D9, e seus respectivos estágios de desenvolvimento.



Como citado, a maioria dos estudos reportam uma menor taxa de recuperação embrionária para o D6, fato que não ocorreu no presente estudo. Além disso, no dia 6 pós-ovulação, tivemos um alto percentual de embriões em estágio de mórula ( $n = 13$ ; 18,3%), estágio esse, que só ocorreu nesse dia. No qual, também foi recuperado a maior parte dos embriões em estágio de blastocisto inicial ( $n = 16$ ; 22,5%). Os outros blastocistos iniciais ( $n = 3$ ; 4,3%) foram recuperados no D7, dia em que também foi possível recuperar a maior parte dos blastocistos ( $n = 15$ ; 21,1%) e parte dos embriões em estágio de blastocisto expandido ( $n = 6$ ; 8,4%). O restante dos blastocistos ( $n = 6$ ; 8,4%) foi recuperado no D8, onde também foram recuperados embriões em estágio de blastocisto expandido ( $n = 9$ ; 12,7%). No dia 9 pós-ovulação só foram recuperados embriões em estágio de blastocisto expandido ( $n = 3$ ; 4,3%).

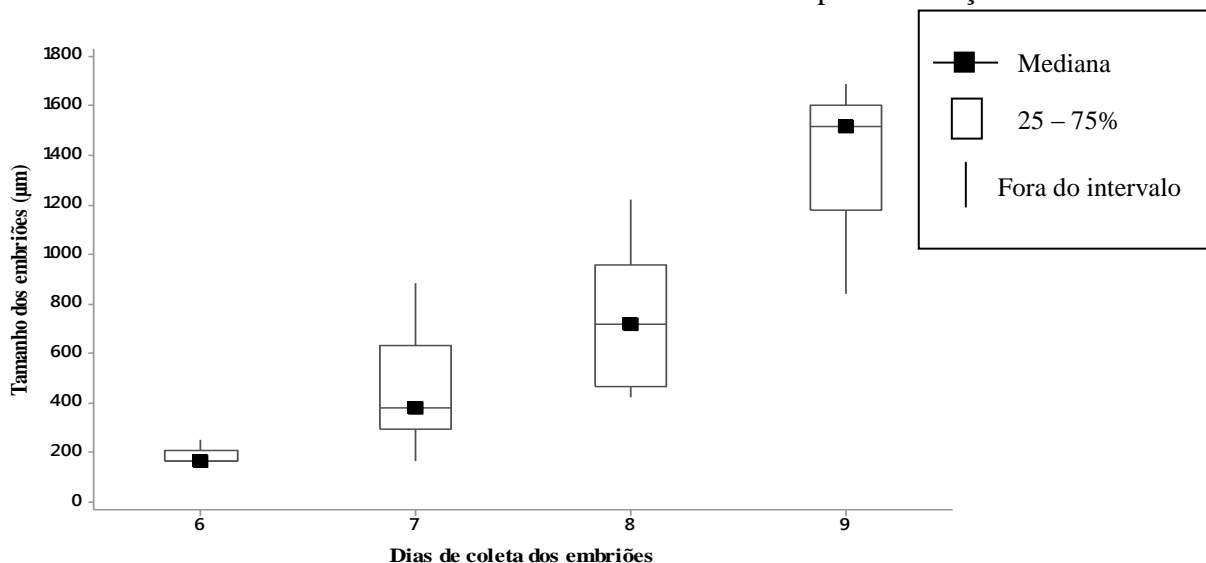
Em um estudo realizado com jumentas, Coelho (2010), coletou embriões oito dias após a ovulação e também obteve diferentes estágios de desenvolvimento, sendo: 9,52% (2/21) de mórula compacta, 38,1% (8/21) de blastocisto e 52,38% (11/21) de blastocisto expandido, demonstrando mais uma vez a possibilidade de recuperação de embriões da mesma idade, porém em diferentes estágios. Esses autores recuperaram um maior número de blastocisto expandido com oito dias de idade, semelhante ao resultado do presente estudo onde esse estágio embrionário foi encontrado na maioria das vezes nos embriões de oito dias e até em embriões de nove dias, entretanto no presente estudo as mórulas só foram recuperadas nos lavados de seis dias após a ovulação, discordando de Coelho (2010). Panzani e colaboradores (2014), em um estudo retrospectivo com éguas de diversas raças, recuperaram embriões entre o sétimo e o décimo dia após ovulação e verificaram que 326/338 (96,4%) foram classificados como blastocisto expandido, 11/338 (3,2%) como blastocisto inicial e 1/338 (0,02%) como mórula, esse resultado mostra o grande número de embriões em estágio avançado de desenvolvimento, e poucos embriões em estágio recente de desenvolvimento,

esse resultado discorda dos resultados do presente estudo, onde o número de mórulas coletadas foi semelhante ao número de embriões em outros estágios de desenvolvimento. A recuperação de embriões híbridos em estágio pouco avançado de desenvolvimento é um grande diferencial para o uso de outras biotécnicas da reprodução, o resultado satisfatório obtido na recuperação dos embriões jovens do presente estudo sugere novamente a possibilidade de que os embriões provenientes do cruzamento de éguas com jumentos possam “chegar” mais cedo ao útero do que os embriões equinos ou asininos. Entretanto, a idade dos embriões pode ter sido subestimada, isso porque, a detecção da ovulação foi realizada somente uma vez ao dia, deixando uma lacuna de quase 24hrs, entre uma avaliação e a avaliação subsequente, e dessa maneira o embrião pode ter sido considerado praticamente um dia mais jovem, mas esse fato não altera o fato do satisfatório número de mórulas recuperadas, o que não é um fato comum na maioria dos estudos envolvendo a recuperação de embriões equinos.

No presente estudo 97,2% (69/71) dos embriões coletados apresentaram morfologia compatível com grau de qualidade I, e 2,8% (2/71) embriões apresentavam qualidade de grau II. A qualidade dos embriões está diretamente ligada às taxas de prenhez, em equinos, em geral os embriões recolhidos em sua grande maioria são de boa qualidade, e muitas vezes embriões de qualidade inferior são provenientes de éguas mais velhas ou com problemas uterinos (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Em equinos, a maioria dos embriões recuperados possui boa qualidade, sendo classificados como grau I e II. Panzani e colaboradores (2014), recuperaram 307 (90,8%) de embriões grau I, 18 (5,3%) embriões grau II, 11 (3,2%) embriões grau III e apenas dois embriões grau IV. Em jumentas 29 embriões foram avaliados como grau I e II (excelente para bom) e somente um embrião foi classificado como grau III (PANZANI et al., 2012).

O tamanho dos embriões foi mensurado e essa é uma característica muito importante, uma vez que embriões de tamanho incompatível com a idade podem prejudicar negativamente a taxa de gestação. O diâmetro dos embriões variou entre 147 - 1688 $\mu$ m, a média do diâmetro de todos os embriões recolhidos foi de 438,04 $\mu$ m, de acordo com os diferentes dias de colheita, o tamanho médio (menor e maior diâmetro) dos embriões foi de: D6 (n = 29) – 183,4 $\mu$ m (147 - 253 $\mu$ m), D7 (n = 24) – 463,2 $\mu$ m (168 - 886 $\mu$ m), D8 (n = 15) – 727,2 $\mu$ m (422 - 1224 $\mu$ m) e D9 (n = 3) – 1350,6 $\mu$ m (844 – 1688 $\mu$ m) (Gráfico 4).

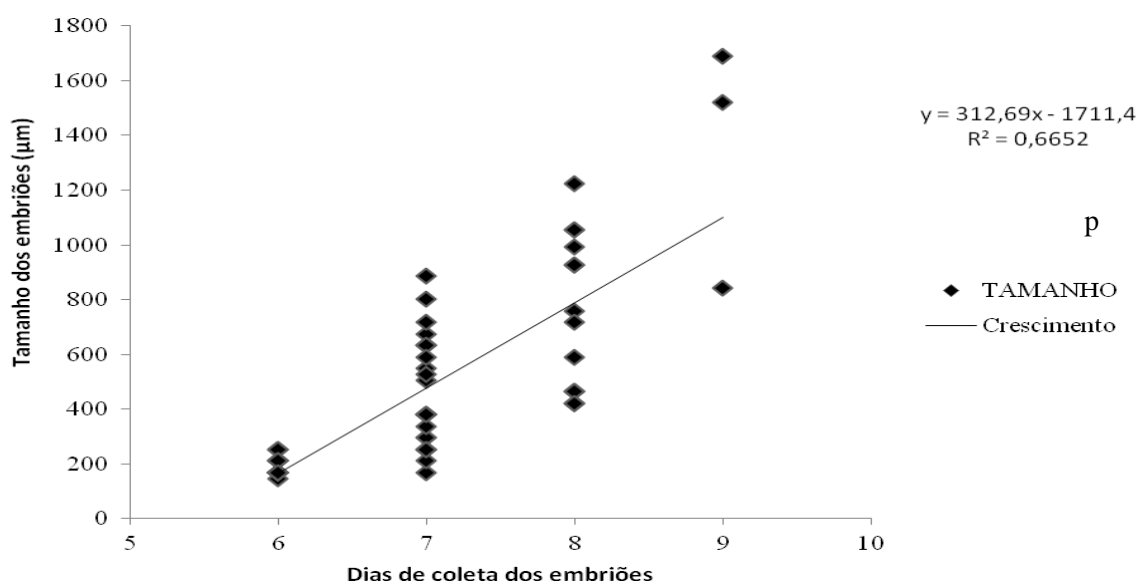
**Gráfico 4.** Diâmetro dos embriões coletados nos diferentes dias após a ovulação.



Quanto ao tamanho dos embriões os resultados corroboram com os achados referente ao diâmetro dos embriões de éguas e de jumentas (MOUSSA et al., 2004; PANZANI et al., 2012; 2014), mas é interessante notar que os diâmetros avaliados tiveram média superior aos estudos citados, e isso pode ter ocorrido, mais uma vez, pela possível subestimativa da idade dos embriões, por causa da detecção da ovulação somente uma vez ao dia. Entretanto, pode ser que os embriões provenientes do cruzamento de éguas com jumentos, apresentem uma taxa de crescimento e desenvolvimento mais rápido do que os embriões equinos e de jumentos, entretanto, esse fato deve ser mais bem avaliado.

Após a análise dos diâmetros embrionários verificou-se que os embriões coletados entre os dias seis e nove após a ovulação, apresentaram um crescimento diário significativo ( $p < 0,05$ ) de  $312,7\mu\text{m}$  a cada dia de crescimento (dias após a ovulação). A análise de regressão linear apresentou  $R^2$  elevado, isso demonstra uma alta correlação entre os dias de colheita dos embriões e o crescimento dos mesmos para cada um dos dias de colheita (Gráfico 5).

**Gráfico 5** – Taxa de crescimento diária dos embriões híbridos.

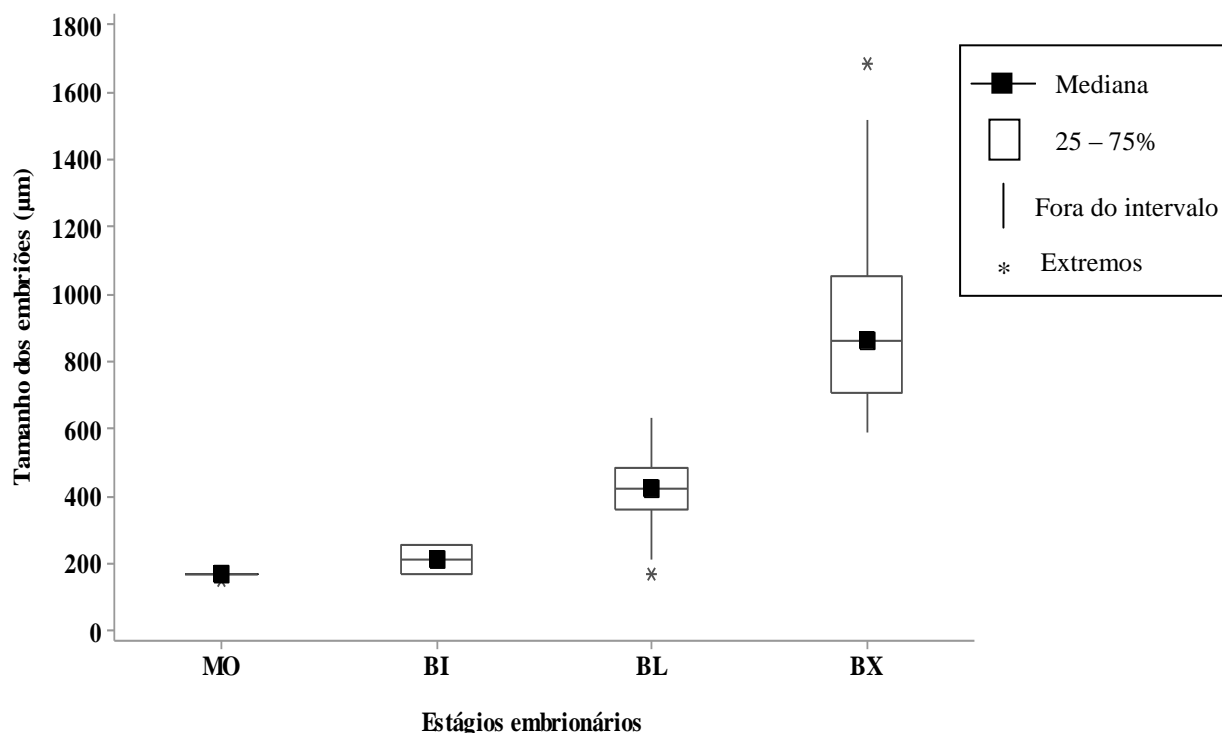


Os embriões recuperados apresentaram diferentes estágios de desenvolvimento e também uma variação no seu tamanho de acordo com o dia de colheita, dessa maneira foi verificado o tamanho dos embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (Gráfico 6).

O tamanho médio dos embriões nos diferentes estágios foi: MO (n = 13) –  $166,4\mu\text{m}$  ( $147 - 168\mu\text{m}$ ); BI (n = 19) –  $206,1\mu\text{m}$  ( $168 - 253\mu\text{m}$ ); BL (n = 21) –  $412,8\mu\text{m}$  ( $211 - 633\mu\text{m}$ ) e BX (n = 18) -  $922,5\mu\text{m}$  ( $591 - 1688\mu\text{m}$ ).

O estudo de McKinnon e Squires (1988) é uma referência em avaliação embrionária em equinos, e segundo os autores, as mórulas apresentam tamanho de  $150$  a  $200\mu\text{m}$ , os blastocistos iniciais:  $150$  a  $250\mu\text{m}$ , blastocistos:  $150$  a  $300\mu\text{m}$  e os blastocistos expandidos:  $300$  a  $> 1000\mu\text{m}$ . Note que no estudo referenciado o diâmetro de blastocisto, blastocisto inicial e mórula são bem semelhantes, e é possível verificar embriões de diferentes estágios, mas com o mesmo tamanho. Contudo, os blastocistos expandidos apresentam um diâmetro bem maior que os demais estágios. Comparando esses valores de referência, com os resultados do presente estudo, verificamos que as mórulas e blastocistos iniciais, tinham diâmetro médio semelhante aos referenciados por McKinnon e Squires (1988), entretanto os estágios de blastocisto e blastocisto expandido apresentaram diâmetro médio superior aos diâmetros utilizados como referência.

**Gráfico 6.** Tamanho dos embriões híbridos em diferentes estágios de desenvolvimento.

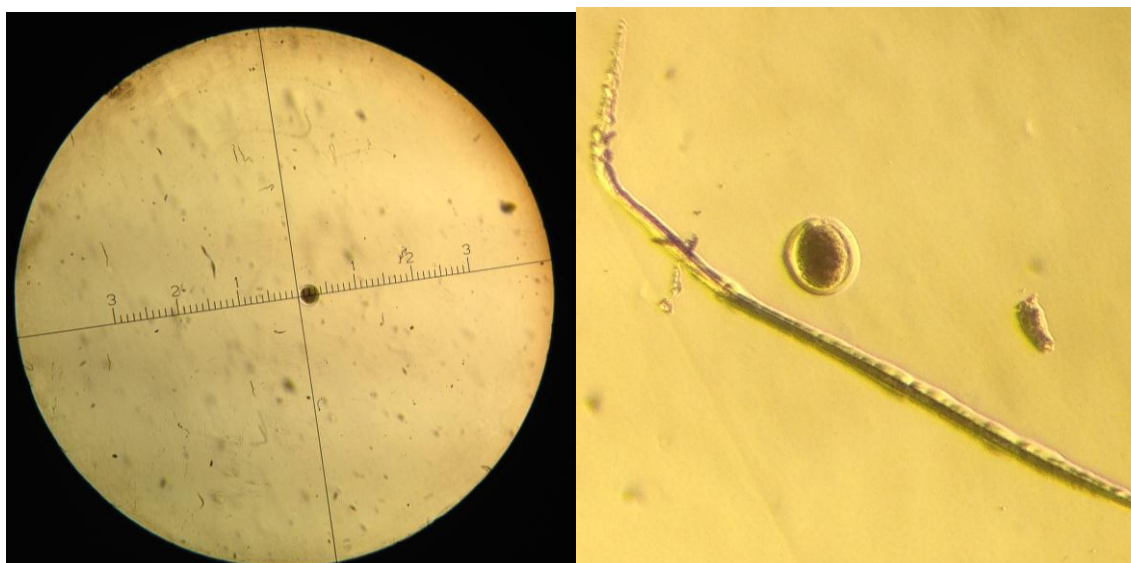


Em jumentas, a avaliação de seis embriões coletados no oitavo dia após a ovulação, revelou quatro blastocistos expandidos - 250 a 525µm (média 383,3µm), um blastocisto - 187,5µm e uma mórula compacta - 150µm (COELHO, 2010), mais uma vez o diâmetro dos embriões híbridos do presente estudo, foi maior que o diâmetro dos embriões asininos. Como retratado anteriormente não pode ser descartada a possibilidade não de que os embriões híbridos, podem se desenvolver mais rápido, e conseqüentemente, podem possuir um diâmetro maior que os embriões equinos e asininos, da mesma maneira que éguas gestantes de fetos híbridos tem o tempo gestacional aumentado em relação a gestação de fetos equinos, bem como as diferenças na formação placentária de éguas cobertas por cavalos x éguas cobertas por jumentos (ALLEN, 1975), entretanto novos estudos devem ser realizados para confirmação desses resultados.

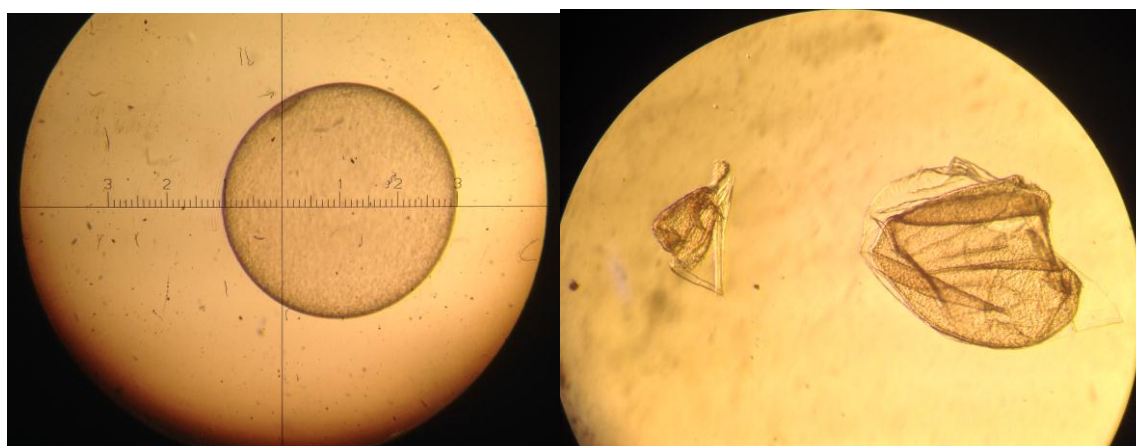
Após a colheita e avaliação, os embriões foram destinados para identificação do sexo, 39/71 (54,9%) embriões não passaram pelo processo de micromanipulação (secção) e os outros 32/71 (45,1%) embriões foram seccionados antes de realizar a PCR.

Nos embriões de menor diâmetro e em estágio embrionário mais jovem (MO e BI), o procedimento foi mais fácil de ser realizado, o corte foi mais preciso, e não provocou danos drásticos ao embrião (Figura 6).

Já nos embriões maiores e em estágio de desenvolvimento mais avançado (BL e BX), o corte foi mais difícil. Muitas vezes o embrião “rolava ou escapava” quando era feita a pressão da lâmina, para realizar o corte. Na maioria dos casos, especialmente naqueles embriões grandes, logo após o corte já era possível visualizar danos severos à estrutura embrionária e o embrião “colabava” ou em alguns casos as células embrionárias se soltavam (Figura 7).



**Figura 6.** Mórula de 169 $\mu$ m de diâmetro antes do corte (A) e depois do corte (B).



**Figura 7.** Blastocisto expandido de 1688 $\mu$ m de diâmetro antes do corte (A) e depois do corte (B).

Foi realizada a transferência de 23 dos 32 embriões que foram seccionados (71,9%). As características de idade, estágio embrionário, e diâmetro dos embriões transferidos estão expostos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características dos embriões seccionados e transferidos para as éguas receptoras.

	DIA DE COLHEITA		
	D6 (n = 15)	D7 (n = 5)	D8 (n=3)
<b>Estágio</b>			
Mórula	26,1% (6/23)	-	-
Blastocisto Inicial	39,2% (9/23)	-	-
Blastocisto	-	17,4% (4/23)	-
Blastocisto Expandido	-	4,3% (1/23)	13% (3/23)
<b>Tamanho</b>			
< 200 $\mu$ m	56,5% (13/23)	-	-
200 - 300 $\mu$ m	8,7% (2/23)	-	-
300 - 500 $\mu$ m	-	8,7% (2/23)	-
> 500 $\mu$ m	-	13% (3/23)	13% (3/23)

Para a transferência foi utilizada a maior parte do embrião resultante da secção e a menor parte foi destinada para a identificação do sexo. As receptoras utilizadas nas

transferências foram previamente sincronizadas com as doadoras, e todas se encontravam entre três e cinco dias de ovuladas.

A taxa de gestação aos 15 dias (idade do embrião) foi de 4,3%, apenas um dos 23 embriões transferidos se desenvolveu. O embrião seccionado que resultou em gestação era uma mórula, coletada no sexto dia após a ovulação, medindo 211µm, porém, não foi possível identificar o sexo desse embrião. Além disso, aos 30 dias de gestação, o embrião não foi identificado. No presente estudo não foram realizadas transferências com embriões híbridos inteiros, para verificar a taxa de gestação resultante dessas transferências. Entretanto, em estudo anterior com resultados não divulgados, o mesmo técnico do presente estudo realizou a transferência de 13 embriões híbridos para o útero de receptoras Mangalarga Marchador e Mestiça, resultando em 9 gestações (69,2%), neste caso, houve perda de 2 embriões aos 30 dias de gestação, e 7 gestações vieram a termo, culminando no nascimento de 4 mulas e 3 burros. Dessa maneira a transferência de embriões híbridos gera boas taxas de gestação, já os embriões seccionados, não resultaram em nenhuma gestação, o que sugere que a secção com a lâmina de bisturi oftalmológico tenha inviabilizado o desenvolvimento dos embriões.

As primeiras técnicas envolvendo a identificação do sexo de embriões necessitavam que grande parte do embrião fosse removida, e isso inviabilizava o desenvolvimento dos mesmos. Entretanto, com o advento da PCR, a identificação do sexo é possível retirando-se apenas uma pequena quantidade de células embrionárias (HUHTINEN et al., 1997). Embora o corte com a lâmina oftalmológica tenha afetado as gestações, é interessante ressaltar que uma gestação foi obtida até os 15 dias, e dessa maneira, o aperfeiçoamento da técnica de secção, usando embriões em estágio de mórula e que sejam pequenos em relação ao diâmetro, podem viabilizar outras gestações no futuro.

Huhtinen e colaboradores (1997) realizaram a microsecção de 14 embriões, com idade de D6 e D7, em estágio de mórula ou blastocisto inicial, e tamanho médio de 179µm. Esses autores conseguiram uma taxa de gestação de 21% (3/14). Muitas vezes a colheita de embriões jovens, ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento é difícil. Por isso, Choi e colaboradores (2010), verificaram a viabilidade de embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento, microaspirando embriões D6 (MO, BI e BL, no caso dos blastocistos já era possível verificar a presença da cápsula), com diâmetro entre 159 e 245µm; D7 (BX, com cápsula bem formada) com 297 - 611µm; e embriões D8 (BX) com 790 - 1350µm, neste caso a taxa de gestação para D6, D7 e D8, foi de 41,6% (5/12), 83% (10/12) e 75% (3/4), respectivamente. Os resultados desses autores evidenciaram que a violação da cápsula não interferiu na viabilidade embrionária. A cápsula é uma estrutura presente no embrião, de grande importância na fase de migração e reconhecimento materno. Danos nessa estrutura prejudicam a taxa de gestação e possivelmente em nosso estudo essa estrutura tenha sido danificada de maneira irreversível inviabilizando a manutenção da gestação nas receptoras. Na metodologia utilizada por Choi e colaboradores (2010), as células embrionárias são extraídas com o uso do micromanipulador por aspiração auxiliada por Piezo Drill e parece ser uma técnica que não danifica a cápsula, diferentemente da técnica de secção com lâmina oftalmológica. Dessa maneira, em embriões em que é possível identificar a cápsula, possivelmente seja necessário a utilização do equipamento de micromanipulação, que torna a técnica mais precisa e sensível, enquanto o uso da lâmina oftalmológica pode ser utilizada, necessitando de mais estudos e desde que seja em embriões sem evidência da formação da cápsula.

Herrera e colaboradores (2014), após a microaspiração de células embrionárias, em embriões com diâmetros < 300µm, 300 - 1000µm ou >1000µm, as taxas de gestação foram de 33,33% (2/6); 62,32% (43/69); 62,07% (18/29), não diferindo ( $p > 0,05$ ) em relação a taxa de gestação dos embriões controle (não aspirado) de mesmo diâmetro 44,44% (4/9); 69,57% (16/23), 57,14% (8/14), respectivamente. Diferentemente do resultado do presente estudo,

isso nos leva a acreditar, que nem a idade, estágio ou o diâmetro, parecem afetar a taxa de gestação após a extração das células embrionárias. O grande diferencial possivelmente é a técnica de extração dessas células e os danos resultantes da mesma.

A identificação do sexo utilizando os *primers* *SRY* e *ZFX/ZFY* ocorreu em 85,9% (61/71) do total de embriões, sendo em 94,9% (37/39) dos embriões inteiros e 75% (24/32) nos seccionados, não havendo diferença significativa em ambos os casos ( $p > 0,05$ ).

Como o conjunto de primers utilizado foi desenvolvido para equinos, os embriões inteiros serviram para verificar a eficiência desses primers na identificação do sexo dos embriões resultantes do cruzamento de éguas com jumentos.

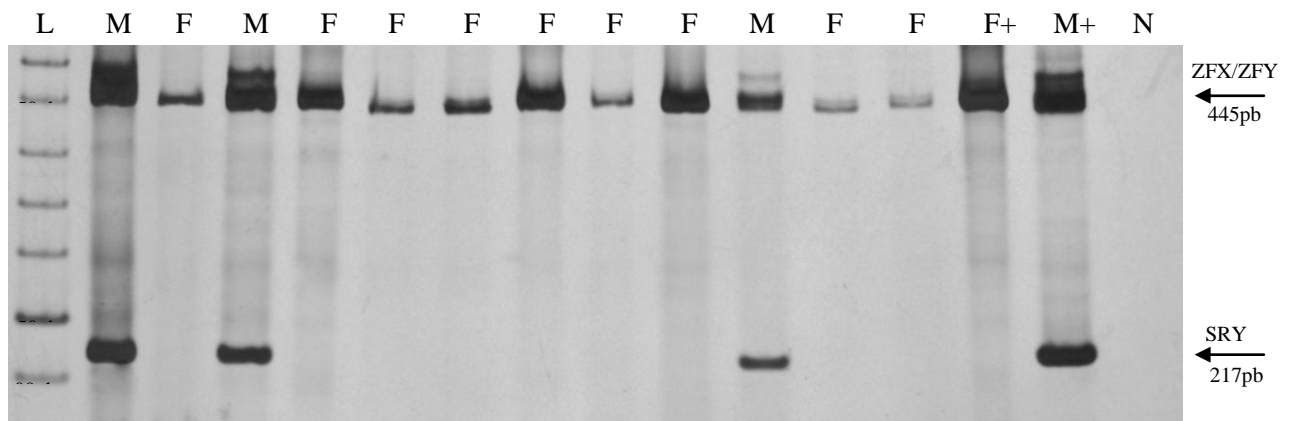
Apesar da técnica de secção com lâmina de bisturi oftalmológico não ter produzido resultados satisfatórios para o desenvolvimento dos embriões após a TE, o número de células obtidas possibilitou material genético suficiente para a realização da PCR e confirmação do sexo nos embriões seccionados, semelhante ao obtido com os embriões inteiros.

Para os embriões onde foi possível determinar o sexo, 55,7% (34/61) eram fêmeas e 44,3 % (27/61) machos, não havendo diferença significativa na razão entre os sexos ( $p > 0,05$ ). A PCR, e os *primers* utilizados foram eficientes na diferenciação dos embriões machos e fêmeas, entretanto, em quatro amostras a confirmação do sexo só correu após a realização de uma segunda PCR com uma concentração de DNA maior do que a utilizada na primeira. Em sete amostras a PCR foi realizada mais de duas vezes, e nestes casos, foram feitos ajustes na concentração de DNA e dos *primers*. Esse tipo de problema torna a identificação do sexo por PCR uma técnica demorada, trabalhosa e promove uma elevação nos custos com a repetição da PCR. Além disso, influencia diretamente na transferência do embrião sexado para o útero da receptora, pois sem o diagnóstico do sexo, o embrião não pode ser transferido, e dessa forma, é necessário que o embrião seja conservado ou vitrificado para transferência tardia.

O resultado da identificação do sexo foi visualizado em gel de poliacrilamida 5% (Figura 8), onde a presença de duas bandas distintas revela uma amostra de macho, sendo que uma banda corresponde ao gene *SRY* e a outra corresponde aos genes *ZFX/ZFY*, que devido à pequena diferença entre os fragmentos intrônicos amplificados dos dois genes, aparece como uma banda, sendo a única presente nas amostras de fêmeas. A presença de bandas mais evidentes e outras mais fracas, provavelmente aconteceu por não ter sido realizada a quantificação do DNA. As amostras com fragmentos amplificados mais evidentes eram provenientes dos embriões maiores e inteiros (maior concentração de DNA), e as bandas mais fracas pertenciam aos embriões seccionados ou os inteiros de menor tamanho.

A eficácia na identificação do sexo nos embriões inteiros, não diferiu ( $p > 0,05$ ) independente da idade (D6, D7, D8 e D9), do estágio (MO, BI, BL e BX) e do tamanho (150 – 300 $\mu$ m, 300 – 600 $\mu$ m, 600 - 900 $\mu$ m e > 900 $\mu$ m) dos embriões. No caso dos embriões inteiros em estágio de blastocisto expandindo, houve diferença ( $p < 0,05$ ) na relação de embriões indentificados como fêmeas (90% - 9/10), em relação aos embriões machos (10% - 1/10).





**Figura 8.** Identificação do sexo dos embriões híbridos de equinos e asininos, por PCR heterodúplex para os genes SRY e ZFX/ZFY, em gel de poliacrilamida a 5% corado por solução de nitrato de prata a 0,2%. (L) DNA Ladder de 50pb; Amostras identificadas como macho (M), presença de duas bandas, correspondentes aos fragmentos dos genes *zfx/zfy* (445pb) e SRY (217pb) ligados aos cromossomos X e Y. Amostras identificadas como fêmeas (F), com presença de apenas uma banda correspondente ao gene ZFX (445pb) ligado ao cromossomo X. Controle positivo de fêmea (F+), Controle positivo macho (M+), Controle negativo (N).

Em relação aos embriões seccionados, a eficácia na identificação do sexo, diferiu em relação à idade, ao estágio embrionário e ao tamanho dos embriões ( $p < 0,05$ ). Entretanto em nenhuma das categorias houve diferença na relação de embriões machos e fêmeas. Nos embriões de seis dias de idade seccionados, a identificação do sexo ocorreu em 56,2% (9/16), diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ), em relação à identificação do sexo dos embriões seccionados com sete dias = 91% (10/11), oito dias = 100% (4/4) e nove dias = 100% (1/1). Nos embriões em estágio de blastocisto inicial a identificação do sexo ocorreu em 30% (3/10) apresentando diferença ( $p < 0,05$ ) em relação às mórulas = 85,7% (6/7), blastocistos = 100% (7/7) e blastocisto expandido = 100% (8/8). Nos embriões de menor tamanho - 150 - 300 $\mu$ m a identificação do sexo ocorreu em 52,9% (9/17), nos embriões dos outros tamanhos a identificação do sexo foi de 100%.

Na Tabela 3, estão discriminados os embriões inteiros e seccionados identificados como machos e fêmeas, de acordo com as categorias de idade, estágio e tamanho.

**Tabela 3.** Identificação do sexo por PCR dos embriões híbridos de equinos e asininos inteiros e seccionados, de acordo com a idade, o estágio e o tamanho dos embriões.

<b>Determinação do sexo</b>							
	<b>Embriões Inteiros</b>			<b>Embriões Seccionados</b>			<b>Total de Embriões Identificados (Inteiros + Seccionados)</b>
	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Total</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Total</b>	
<b>Idade</b>							
6	61,5% (8/13)	30,8% (4/13)	92,3% (12/13)	25% (4/16)	31,2% (5/16)	56,3% (9/16) <sup>a</sup>	29,6% (21/71)
7	53,8% (7/13)	38,5% (5/13)	92,3% (12/13)	45,5% (5/11)	45,5% (5/11)	90,9% (10/11) <sup>b</sup>	31% (22/71)
8	63,6% (7/11)	36,4% (4/11)	100% (11/11)	-	100% (4/4)	100% (4/4) <sup>b</sup>	21,1% (15/71)
9	100% (2/2)	-	100% (2/2)	100% (1/1)	-	100% (1/1) <sup>b</sup>	4,2% (3/71)
<b>Estágio</b>							
MO	50% (3/6)	50% (3/6)	100% (6/6)	42,8% (3/7)	42,8% (3/7)	85,7% (6/7) <sup>b</sup>	16,9% (12/71)
BI	66,7% (6/9)	22,2% (2/9)	88,9% (8/9)	10% (1/10)	20% (2/10)	30% (3/10) <sup>a</sup>	15,5% (11/71)
BL	42,8% (6/14)	50% (7/14)	92,8% (13/14)	42,8% (3/7)	57,2% (4/7)	100% (7/7) <sup>b</sup>	28,2% (20/71)
Bx	90% (9/10) <sup>a</sup>	10% (1/10) <sup>b</sup>	100% (10/10)	37,5% (3/8)	62,5% (5/8)	100% (8/8) <sup>b</sup>	25,3% (18/71)
<b>Tamanho</b>							
150 - 300µm	57,9% (11/19)	36,8% (7/19)	94,7% (18/19)	23,5% (4/17)	29,4% (5/17)	52,9% (9/17) <sup>a</sup>	38% (27/71)
300 - 600µm	45,4% (5/11)	45,4% (5/11)	90,9% (10/11)	50% (3/6)	50% (3/6)	100% (6/6) <sup>b</sup>	22,5% (16/71)
600 - 900µm	83,3% (5/6)	16,7% (1/6)	100% (6/6)	50% (2/4)	50% (2/4)	100% (4/4) <sup>b</sup>	14,1% (10/71)
>900µm	100% (3/3)	-	100% (3/3)	20% (1/5)	80% (4/5)	100% (5/5) <sup>b</sup>	11,3% (8/71)
<b>Total Geral</b>	61,5% (24/39)	33,4% (13/39)	94,9% (37/39)	31,3% (10/32)	43,7% (14/32)	75% (24/32)	85,9% (61/71)

a,b – letras diferentes, demonstram diferença significativa ( $p < 0,05$ )

É interessante notar que os embriões seccionados coletados no D6, aqueles classificados como blastocisto inicial, e os embriões com diâmetro entre 150 - 300µm, foram os embriões com o menor sucesso na identificação do sexo. Isso pode ter acontecido porque a quantidade de DNA resultante da biópsia não foi suficiente para a amplificação por PCR, ou a biópsia pode ter sido perdida no momento de sua transferência para o tubo tipo *eppendorf*, assim como relatado por Peippo e colaboradores (1995), que também utilizaram um conjunto de *primers ZFX/ZFY*, e demonstraram um resultado de 95% na determinação do sexo. Esses autores seccionaram os embriões em diversas “partes”, e relatam que não foram verificadas diferenças em relação ao sexo para as diferentes “partes” de um mesmo embrião. Entretanto, em algumas “partes” não foi possível verificar o sexo, porque a biópsia pode ter sido perdida. A hipótese de perda da biópsia é sustentada por Cullingford (2010), uma vez que o autor usou o mesmo conjunto de *primers* do presente estudo, e obteve sucesso na identificação do sexo em apenas 30% (11/37) das amostras. Inicialmente o autor sugeriu que o teste utilizado tinha baixa sensibilidade, porém essa hipótese foi descartada porque uma amostra em que a concentração do DNA era conhecida foi realizada a diluição até a concentração de apenas uma célula e a eficácia do teste foi de 100%. No estudo de Cullingford (2010), só foram realizadas biópsias em embriões em estágio de mórula e blastocisto, e apenas nos blastocistos foi possível determinar o sexo. No presente estudo, os blastocistos seccionados também foram 100% identificados, e as mórulas, apenas uma não foi possível identificar o sexo, a maior dificuldade foi em relação aos blastocistos iniciais o que sugere novamente que pode ter acontecido a perda da amostra seccionada.

Pelos achados de identificação do sexo é possível perceber que a metodologia adotada para a sexagem embrionária, inviabilizou o desenvolvimento dos embriões, com a ocorrência de somente uma gestação até os 15 dias, demonstrando que a técnica causou danos severos aos embriões, mas o aperfeiçoamento da técnica pode permitir seu uso especialmente nos embriões jovens. Entretanto, a metodologia adotada foi eficaz e precisa na determinação do sexo, com um alto percentual de sucesso.

## 5 CONCLUSÕES

- A taxa de recuperação embrionária de híbridos *Equus caballus* e *Equus Asinus* no presente estudo foi satisfatória (55,9%) o que sugere que a TE pode ser utilizada para a produção de muares.
- A taxa de recuperação embrionária dos embriões híbridos não diferiu entre os dias de colheita, o que possibilita a coleta de embriões jovens e pequenos que são os melhores para o uso de outras biotecnologias, como sexagem por DNA ou congelamento embrionário.
- A recuperação embrionária em D6 se mostrou tão eficiente o que sugere que os embriões híbridos podem “chegar” antes ao útero do que os embriões equinos, fato este que deve ser avaliado posteriormente com mais cautela.
- Os embriões muares não apresentam divergências morfológicas em relação aos embriões equinos e asininos, entretanto, aparentemente, o desenvolvimento dos mesmos é mais rápido do que nas outras espécies, o que sugere novamente uma diferença no desenvolvimento inicial dos mesmos.
- O uso de uma técnica alternativa de micromanipulação embrionária com o uso de uma lâmina de bisturi oftalmológico permitiu a extração de células embrionárias para a identificação do sexo em 75% dos embriões seccionados. Essa técnica foi empregada com maior facilidade nos embriões menores e mais jovens, produzindo uma secção mais precisa e causando menos danos ao embrião.
- A utilização dos primers ZFX/ZFY e SRY de equinos, foi eficiente e preciso na identificação do sexo dos embriões híbridos. Nos casos onde o sexo não foi identificado, o problema possivelmente decorreu da perda da amostra, e não por falha na PCR.
- A extração das células embrionárias inviabilizou o desenvolvimento gestacional, entretanto, uma gestação foi observada até os 15 dias de um embrião D6 em estágio de mórula. Dessa forma, o aperfeiçoamento da técnica de micromanipulação com ferramentas mais simples pode permitir que a técnica seja utilizada com sucesso especialmente nos embriões mais jovens.

## 6 REFERÊNCIAS

- AFONSO, T.S.M. **Transferência de embriões na égua. 2008. 94p.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- ALLEN, W.R.; MOOR, R.M. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. **Journal Reproduction and Fertility**. v. 29, p. 313-316, 1972.
- ALLEN, W.R.; ROWSON, L.E. A. Surgical and non surgical egg transfer in horses. **Journal Reproduction Fertility**, (Suppl. 23): p. 525-530, 1975.
- ALLEN, W.R. The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids. **Journal Reproduction and Fertility**. v. 23, p. 405-413, 1975.
- ALLEN, W.R. Artificial control of the mare's oestrus cycle. **Veterinary Record**, v. 104, p. 166, 1977.
- ALLEN, W.R.; KYDD, J.; BOYLE, M.S.; ANTCZAC, D.F. Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool. **Equine Veterinary Journal**, v.3, p.53 - 62, 1985.
- ALLEN, W.R.; SHORT, R.V. Interspecific and Extraspecific Pregnancies in Equids: Anything Goes. **Journal of Heredity**, v. 8; p.384-392, 1997.
- ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513- 527, 2001.
- ALLEN, W.R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P.D.; FOWDEN, A.L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse: I. Development in utero. **Reproduction**, v. 123, p. 445-53, 2002.
- ALLEN, W.R.; WILSHER, S.; TIPLADY, C.; BUTTERFIELD, R.M. The influence of maternal size on pre and post natal growth in the horse: III Postnatal growth. **Reproduction**, v. 127, p. 67-77, 2004.
- ALLEN, W.R.; WILSHER, S. A. Review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**. V. 30, p. 1005-1015, 2009.
- ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ, R.H. Métodos de determinação do sexo de embriões bovinos. **Boletim da Indústria Animal**. V.60, n. 2, p. 185 - 196, 2003.
- ALONSO, M.A. **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião.** 2007. 87p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

ALONSO, M.A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embrião In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, v.36 (supl.1), 2008, Guarujá. **Anais...** São Paulo: **Acta Science Veterinariae**, p. 207-214.

ALONSO, R.V. **Fatores que afetam a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro em programa de sexagem comercial**. 2008. 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Câmpus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP.

ALVARENGA, M.A.; ALVARENGA, F.C.L.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. In: International Symposium on Equine Embryo Transfer, 13., 1992, Buenos Aires, Argentina. **Resumos...** Buenos Aires, p. 34-35.

ALVARENGA, M.A. Problemas e soluções em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2010, Porto de Galinhas. **Workshop 2: Estratégias de otimização da produção de embriões em programas de TE em equinos**, Pernambuco: **Acta Science Veterinariae**, p.59-62.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ANDERSON, W.S. Fertile mare mules. **Journal of Heredity**, v. 30, p. 549 – 551, 1939.

ÁNGEL, A.; BRAN, J.A. Reproducción asistida em equinos: aportes desde la teoria. **Revista CES – Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v.5, n.1, p. 56 – 69, 2010.

AURICH, C.; SCHNEIDER, J. Sex determination in horses – Current status and future perspectives. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 34 – 41, 2014.

BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: **Methods in Molecular Biology: PCR protocols**. Totowa, NJ, 2003, v. 226.

BEAL, J. **Indução da ovulação em éguas crioulas com diferentes dose de Gonadotropina Coriônica Humana**. 2008. 39p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Universidade de Santa Maria, RS.

BEATTY, R. A. Genetic basis for the determination of sex. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Series B: **Biological Science***, London, v. 259, p. 3-13, 1970.

BEREZOWSKI, C.J.; STITCH, K.L.; WENDT, K.M.; VEST D.J. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n.6, p. 231-233, 2004.

BERGFELT, D.R. Estrous synchronization. In: SAMPER J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Pennsylvania: Saunders, 1999, p.229-246.

BERGFELT, D.R. Estrous synchronization. mare In: SAMPER J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. (2ed). Philadelphia: Saunders, 2000, p. 195-228.

BESSENT, C.; GINTHER, O.J. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies. *Theriogenology*. v. 29, n.4, p. 913 – 920, 1987.

BETTERIDGE, K. J.; HARE, W. C. D.; SINGH, E. L. Approaches to sex selection in farm animals. In: BRACKETT, B.G.; SEIDEL, G.E.JR.; SEIDEL, S.M.. **New technologies in animal breeding**. New York: Academic Press, 1981. p.109-125.

BETTERIDGE, K.J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 691-702, 2000.

BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 8, p. 105-110, 1989.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. **Manual of Equine Reproduction**. 1<sup>ed</sup>. Publicado por: C.V. MOSBY, p.22-23, 1998.

BLANCHARD, T.L.; DICKSON, D.V.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of equine reproduction**. 2<sup>ed</sup>. St. Louis: C.V. MOSBY, p.219 - 228, 2003.

BREDBACKA, P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 23-34, 2001.

BRINSKO, S.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Transported Equine Semen. In: BALL, B.A. (Ed). *International Veterinary Information Service (IVIS)*. New York: **Recent Advances in Equine Reproduction**, 2000.

BOAKARI, Y.L. **Efeito da hCG ou Deslorelina sobre a hemodinâmica folicular e perfil endógeno de LH em éguas cíclicas**. 2014. 75p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP.

BORTOT, D.C; ZAPPA, V. Aspectos da Reprodução Equina: Inseminação Artificial e Transferência de Embrião: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano XI, n.21, jul - 2013.

BROCK, T.D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Non-sporulating Extreme Thermophile. **Journal of Bacteriology**, v.98, n.1 p. 289-297, 1969.

BURNHAM, S.L. Anatomical Differences of the Donkey and Mule. In: 48th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2002, Florida, USA. **Proceedings...Ithaca: International Veterinary Information Service**, p. 102-109.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S.; FONTES, R.S.F. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CAMARGO, C.E.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; DUARTE, M.P.; DUARTE, M.C.G.; BERTOL, M.A.F.; GAIEVSKI, F.R.; BASTOS, G.M. Aspectos relacionados com a

recuperação embrionária em éguas da raça brasileiro de hipismo, utilizadas em um programa comercial de transferência de embrião. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.4, p. 74-83, 2013.

CAMILO, F.; VANNOZZI, I.; LUZIO, B. D.; ROMANGNOLI, S.; ARIA, G.; ALLEN, W. R. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 380-385, 2003

CAMILLO, F.; PACINI, M.; PANZANI, D.; VANNOZZI, I.; ROTA, A.; ARIA, G. Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mare. **Veterinary Research Communications**, v. 28 (Suppl 1), p. 169–72, 2004.

CAMILLO, F.; PANZANI, D.; SCOLLO, A.C.; ROTA, A.; CRISCI, A.; VANNOZZI, I.; BALBO, S. Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. **Theriogenology**, v. 73, p. 959 – 965, 2010.

CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; DAVIES MOREL, M.C.G.; GUIMARÃES, J.D.; McDONNELL, S.M. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). **Theriogenology**, v.73, p.56-63, 2010.

CARNEIRO, G.F. Transferência de embriões em equinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, p. 1-6.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 965-979, 2000.

CARMO, M. T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de Pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP.

CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; SANTOS SILVA, M.F.; PEREIRA, R.M. Implementação de um método simples e preciso para sexagem de embriões bovinos. **Ciências Veterinárias – 3º Congresso da SPCV**, livro de resumos, 2005.

CARVALHO, G.R. **Estudos de alguns aspectos da transferência de embriões equinos**. 2000. 102p. Tese (doutorado) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CARVALHO, G.R.; FILHO, J.M.S.; FONSECA, F.A.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M. Influência da técnica de coleta sobre a taxa de recuperação de embriões equinos. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 5, 2001.

CHANDLEY, A.C. Fertile mules. **Journal of the Royal Society Medicine**, v. 81, p.2, 1988.

CHAVATTE, P.; PALMER, E. Induction of ovulation in the mare. **Equine Veterinary Education**, v. 10, n.1, p. 26-30, 1998.



CHOI, Y.H.; GUSTAFSON-SEABURY, A.; VELEZ, I.C.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.; RIERA, F.L.; ROLDÁN, J.E.; CHOWDHARY, B.; HINRICHS, K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. **Reproduction**, v.140, p.893 – 902, 2010.

COELHO, P.G.B. **Acompanhamento folicular, adaptação da técnica de coleta de embriões e avaliações morfológica e morfométrica de embriões de jumentas da raça pêga**. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

COSTA, A.L.A. **Controle reprodutivo e transferência de embriões em equinos**. 2010, 33p. Relatório final de estágio Mestrado Integrado em Medicina Veterinária – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J.; NEWCOMBE, J.R. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. **Theriogenology**, v. 71, p. 1267-1275, 2009.

CULLINGFORD, E.L. **Preimplantation genetic diagnosis of equine embryos**. 2010. 66p. Tese (Doutorado) – Colorado State University – Colorado.

DAELS, P.F.; HUGHES, J.P. The normal estrous cycle. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed) **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993, p. 121-132.

DAELS, P. Embryo transfer tips and tricks. In: 5<sup>th</sup> Scientific Proceedings Equine Programme, 2007, Voorjaarsdagen, Amsterdam, **Abstracts...** Voorjaarsdagen, p. 213-215.

DAY, F.T. Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after treatment with the gonadotrophic hormones. **Journal of Agricultural Science**, v. 29, p.459-469, 1939.

DÍAZ, N.; DUVERGER, O.; DENIS, R.; BARBA, F.; GUERMES, J.E.; PÉREZ, Y.; ORTEGA, V. Resultados preliminares sobre fertilidad en yeguas inseminadas con semen fresco de burros para la obtención de mulus (*Equus mulus*). **Ciencia y Tecnología. Ganadera**, v.3, n.2, p.65-67, 2009.

DRIANCOURT, M.A.; PALMER, E. Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 283-291, 1982.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 35, p. 221 - 228, 1987.

ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. **Science**, v.252 (5013), p. 1643-1651, 1991.

ENDERS, A.C.; LIU, I.K. Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. **Journal Reproduction Fertility Supplement**, v. 44, p. 427-38, 1991.

FAO – Food and agriculture organization of the United Nations. Disponível em: [faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor](http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor) acesso em 10 de julho de 2015.

FARIA, D. R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada á ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 114-122, 2010.

FARINASSO, A.; DE FARIA, A.; MARIANTE, S.; DE BEM, A.R. Embryo technology applied to the conservation of equids. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, p. 84 - 86, 1989.

FARQUHAR, V.J.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; SQUIRES, E.L. Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n.11, 2000.

FILHO, A.N.R. **Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de Pituitária ou FSH purificado eqüino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas**. 2005. 64p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

FITZGERALD B.P.; McMANUS C.J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 335-340, 2000.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; COSTA NETO, J.B.F.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 485-487, 1987.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 51, p. 261, 1999.

FLEURY, J.J.; PINTO, A.J.; CELEGHINI, E.C.C.; LIMA, C.G.; ARRUDA, R.P. Efeitos do ganhão e técnica reprodutiva sobre os índices de recuperação e gestação em um programa de transferência de embriões na raça mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 34-37, 2001.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, 2006, Araxá, Minas Gerais, **Anais...** Araxá, Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, n. 1; p. 502, 2006.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; SOUSA, F.A.C.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n.1, p. 27-31, 2007.

FORHEAD, A.J.; OUSEY, J.C.; ALLEN, W.R.; FOWDEN, A.L. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. **Journal Endocrinology**, v. 181, p. 459-67, 2004.

FRANÇA, N.A. **Factores que afectam as taxas de gestação após transferência de embriões equinos**. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

GASTAL, E.L.; BARROS, L.O.; CARNEIRO, G.F.; GASTAL, M.O. Follicular dynamics in mules. **Journal of Equine Veterinary Science**. V.34, p. 144, 2014.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**. 2<sup>a</sup> Ed. Wisconsin: Equiservices, p. 642, 1992.

GINTHER, O.J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v.19, p.603-611, 1983.

GINTHER, O.J. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. **Proceedings American Association Equine Practitioners**, v.44, p.73-105, 1998

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 454-460, 2008.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17<sub>β</sub>-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311–317, 2009.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; DOMINGUES, I.B. Utilization of mares after first post partum ovulation as embryo recipients, In: 6<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2004, Rio de Janeiro, Brasil. **Proceedings...Rio de Janeiro**.

GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M. Fatores que influenciam a produção de embriões em éguas doadoras. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. **Anais... São Paulo, Acta Science Veterinariae**, v. 36 (supl.2), n.1, p. 199-206.

GOMES, R.G.; SILVA, C.B.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M. Taxa de recuperação embrionária em éguas submetidas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato. **Revista Acadêmica Ciência Agrária Ambiental**, v.12, n.2, p.121-126, 2014.

GONCZAROWSKA, A.T.; **Diferentes aspectos da fecundidade do sêmen de jumentos e da gestação de éguas submetidas à cruzamentos inter-espécie**. 2011. 304p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG.

GORETTI, R.G.; ARAÚJO, R.R.; ROCHA FILHO, A.N.; ARAÚJO, G.H.M.; LOPES, E.P. Effects of timing of induced luteolysis in embryo donor mares on reproductive performance and pregnancy rate in recipient mares. **Theriogenology**. v. 75, p.1170-1174, 2011.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Manole, 7 ed, p. 513, 2004.

- HAN, S.H.; YANG, B.C.; KO, M.S.; OH, H.S.; LEE, S.S. Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. V.27, n.12, p.725-728, 2010.
- HENNEKE, D.G.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATS, B.F. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, n.4, p.371-372, 1983.
- HENRY, M.; LAGO, L.A.; MENDONÇA, L.F. Asininos: animais com características sociais e reprodutivas próprias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.223 – 230, 2009.
- HERR, C.M.; REED, K.C.; Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. **Theriogenology**, v.35, n.1, p.45-54, 1991.
- HERRERA, C.; MORIKAWA, M.I.; BELLO, M.B.; VON MEYEREN, M.; EUSEBIO CENTENO, J.; DUFOURQ, P.; MARTINEZ, M.M.; LLORENTE, J. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**. v.81, p. 758 – 763, 2014.
- HERRERA, C.; MORIKAWA, M.I.; BACA CASTEX, C.; PINTO, M.R.; ORTEGA, N.; FANTI, T.; GARAGUSO, R.; FRANCO, M.J.; CASTAÑARES, M.; CASTAÑEIRA, C.; LOSINNO, L.; MIRAGAYA, M.H.; MUTTO, A.A. Blastocle fluid from *in vitro* – and *in vivo* – produced equine embryos contains nuclear DN. **Theriogenology**, v.83, p. 415 – 420, 2015.
- HINRICHS, K. A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. **Theriogenology**, v.33, p. 937-942, 1990.
- HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. **Animal Reproduction Science**, v. 33; p. 227-40, 1993.
- HINRICHS, K.; CHOI, Y.H. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, p.210-218, 2005.
- HUDSON, J.J.; McCUE, P.M. How to increase embryo recovery rates and transfer success. In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2004, Denver. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, p. 1473-1204.
- HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. Estrous cycle and ovulation in the mare. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 161, p. 1367-1374, 1972.
- HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; EVANS, J.W. The oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 23, p. 161-166, 1975.
- HSU, T.C.; BENIRSCHKE, K. Comparative aspects of mammalian cytogenetics. Conference Held in Hanover, NH, 1968. Springer, Berlin.

HUHTINEN, M.; PEIPPO, J.; BREDBACKA, P. Successful transfer of biopsied equine embryos. **Theriogenology**, v. 48, p.361 – 367, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 24/5/2015.

INZUNZA, J.; IWARSSON, E.; FRIDSTROM, M.; ROSENLUND, B.; SJOBLUM, P.; HILLENSJO, T.; BLENNOW, E.; JONES, B.; NORDENSKJOLD, M.; AHRLUND-RIECHTER, I. Application of single-needle blastomere biopsy in human preimplantation genetic diagnosis. **Prenatal Diagnosis**, v.18, p.1381-1388, 1998.

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

IULIANO, M.F.; SQUIRES, E.L; COOK, V.M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal Animal Science**, v. 60, n.1, p. 258-63, 1985.

JACOB, J.C.F.; DOMINGUES, I.B.; GASTAL, E.L. et al. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 545, 2002.

JACOB, J.C.F.; SANTOS, G.O.; OLIVEIRA, J.P.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. **Animal Reproduction Science**, v.121, n. 1, p. 305-306, 2010.

JACOB, J.C.F.; SANTOS, G.O.; SÁ, M.A.F.; OLIVEIRA, J P. Uso clínico de hCG em um programa de transferência de embriões equino: mitos e verdades. **A Hora Veterinária**, Ano 30, n.180, 2011.

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.

JACOBS, P.A.; ROSS, A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. **Nature**, London, v. 210, p. 352-354, 1966.

JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. **Theriogenology**, v. 58, p. 713-716, 2002.

JOHNSON, C. A. The role of fetal testicle in sexual differentiation. *Comparative Compendium of Continuing Education in Veterinarians Practitioners*. Jamesburg, v. 5, p. 129-132, 1983.

JOST, A.; MAGRES, S. Sexual differentiation. In: THIBAUT, C.; LEVASSUER, M. C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. p. 450, 1993.

KING, W.A. Sexing embryos by cytological methods. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.7-17, 1984.

KLOHONATZ, K.K.; BOUNA, G.J.; BRUENMER, J.E. Equine endometrial gene expression during maternal recognition of pregnancy. **Journal Equine Veterinary Science**, v.33; p.372, 2013.

KNOTTENBELT, D; LeBLANC M.; LOPATE, C.; PASCOE, R. The mare. In: LeBLANC M.; LOPATE, C.; KNOTTENBELT, D; PASCOE, R. **Equine stud farm medicine and surgery V**. Saunders Elsevier Science, 1<sup>o</sup> ed, 2003, p. 113-212.

KÖLLING, M.; ALLEN, W.R. Ovulation induction for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue. Havemeyer Foundation Monograph Serie. n. 18, p. 54-55, 2005.

KUMAR, D.; JHAMB, D.; KUMAR, N.; BADIAL, D. Foals born through fresh embryo transfer in India. In: **Proceedings of 10th International Congress of World Equine Veterinary Association**, Moscow, Russia: IVIS;. p.567-568, 2008.

LANDIM E ALVARENGA, F.C. **Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos**. 1995. 102p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LeBLANC, M.M. Reproduction Deduction – Part 2. In: **Proceedings of North America Veterinary Conference**, Orlando, 2006.

LIMA, L.M.; Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**, v.191 – 28p. 2008

LIRA, R. A., PEIXOTO, G.C.X., SILVA, A.R. Transferência de embrião em equinos: Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

LISA, H.M.; MEADOWS, S. Essential management practices in commercial equine embryo transfer. **Proceedings 7<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer**, Cambridge, UK, p. 101-102, 2008.

LOPATAROVA, M.; CECH, S.; KRONTORAD, P.; HOLY, L.; HLAVICOVA, J.; DOLEZEL, R. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. **Veterinarni Medicina**, v.53, n.11, p.595 – 603, 2008.

LOPATAROVA, M.; CECH, S.; KRONTORAD, P.; HOLY, L.; LALOVA, H.; DOLEZEL, R. Conception rate after sex determination and cryopreservation of D7 bovine embryos. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 1, p. 10-18, 2010.

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. . In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2006, Araxá. **Anais...** Araxá: Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, p. 39-49.

LOSINNO, L. Factores críticos del manejo embrionario en programas de transferencia embrionaria en equinos. **Proceedings del I Congreso Argentino de Reproducción Equina**, p. 89-94, 2009.

MAIO, J.R.G.; FLEURY, P.D.C.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; TEIXEIRA, A.A.; SOUZA, E.D.F.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de éguas adultas cíclicas tratadas com diferentes indutores de ovulação. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, 2010, Porto de Galinhas. **ANAIS...**, Pernambuco, Acta Science Veterinariae, p.365.

MALINOWSKY, K. Recent advances in reproduction in horses. In: <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs717>, 2002.

MALTER, H.E.; COHEN, J. Partial zona dissection of the human oocyte: a non-traumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. **Fertility and Sterility**, v. 51, p. 139-148, 1989.

MANNA, L.; NEGLIA, G.; MARINO, M.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. Sex determination of buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) by polymerase chain reaction. **Zygote**, v.11, p. 17-22, 2003.

MARA, L.; PILICHI, S.; SANNA, A.; ACCARDO, C.; CHESSA, B.; CHESSA, F.; DATTENA, M.; BOMBOI, G.; CAPPAL, P. Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. **Molecular Reproduction and Development**, v.69, p. 35-42, 2004.

MARTINHAGO, C.D. **Identificação do sexo de embriões humanos através da análise de blastômeros pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e hibridização in situ fluorescente (FISH)**. 2007. 133p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP.

McCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; KEITH, S.L.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 267, 1999.

McCUE, P.M.; MAGEE, C.; GEE, E.K. Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 2, p. 58-61, 2007.

McCUE, P.M. Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.9, n.3, p. 80 – 83, 2011.

MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biological Reproduction**, v. 39, p. 340-348, 1988.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 305-330, 1988.

McKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, N.J.; CARNEY; SEIDEL Jr., G.E. Bisection of equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v.3, suppl.8, p.129-133, 1989.

McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. The estrous cycles. In: McKINNON, **Equine Reproduction.**, Malvern: Lea & Febizer, p. 114–189, 1993.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo transfer and related technologies. In: **Current Therapy Equine Reproduction**, Saunders, Missouri, p. 319-334, 2007.

MEIRA, C.; FERREIRA, J.C.P; PAPA, F.O.; HENRY, M. Ultrasonographic evaluation of the conceptus from days 10 to 60 of pregnancy in jennies. **Theriogenology**. V.49, p.1475-1482, 1998.

MEIRA, C.; FERREIRA, J.C.; SILVA, E.S.M.; IGNÁCIO, F.S. Developmental aspects of early pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.166 – 172, 2012.

MELO, A.N.; SANTOS JÚNIOR, E.R.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.2, p.105 – 112, 2012.

METCALF, E. Equine embryo transfer. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M.; SELTON D.C., **Equine Internal Medicine**, St. Louis: Saunders, 2<sup>o</sup> ed., p. 1073-1079, 2004.

MONAHAN, M.W., AMOSS, M.S., ANDERSON, H.A., VALE, W. Synthetic analogs of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor with increased agonist or antagonist properties. **Biochemistry**, v. 12, p. 4616-4620, 1973.

MOREL, M.D. Endocrine control of reproduction in the mare. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management III**, Cabi publishing, 2<sup>nd</sup> ed., p. 28-39, 2003.

MOREIRA, M.A.M. SRY evolution in Cebidae (Platyrrhini: Primates). **Journal Molecular Evolution**, n. 55, p.92–103, 2002.

MORRIS, L.H.; ALLEN, W.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, v. 34; p. 51-60, 2002.

MORTENSEN, C.J.; CHOI, Y.H.; HINRICH, K.; ING, N.H.; KRAEMER, D.C.; VOGELSANG, S.G. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science**. v.110, p. 237-244, 2009.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J.F.; DAELS, P.F. Correlation between the number of cells and the diameter of equine embryos between 6,5 and 9 days. In: Scientific Meeting Of The European Embryo Transfer Association, 20., 2004, França. **PROCEEDINGS ...França, 2004**. p.160. (abstract).

MOZZAQUATRO, F.D. **Aspiração folicular na égua para indução da função lútea**. 2008. 70p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.



NEELY, D. P. Reproductive endocrinology and fertility in the mare. In: **Equine reproduction**. Nutley, NJ, p.50-52, 1983.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 187-195, 1972.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 41, p. 313-320, 1974.

OLIVEIRA, L.A.; SOUZA, J.A.T. Eficiência do hCG e LH na indução da ovulação e taxa de gestação em éguas da raça Quarto de Milha submetidas à cobertura única em tempo fixo. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.27, p.504-506, 2003.

OLIVEIRA, V.B. **Uma visão técnica e pedagógica sobre os muares**. 2004. 131p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ.

OLIVEIRA, V.B.; SANCHES, S.B.; ALMEIDA, F.Q. Muares: tema transversal para o ensino médio e técnico em Agropecuária. Rio de Janeiro, RJ. Publit 2<sup>o</sup> Ed., 2007, 123p.

ORIOLO, J.G.; BETTERIDGE, K.J.; HARDY, J.; et al. Structural and developmental relationship between capsular glycoproteins of the horse (*Equus caballus*) and the donkey (*Equus asinus*). **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 14-18, 1993.

OUSEY, J.C.; DUDAN, F.; ROSSDALE, P.D. Preliminary studies of mammary secretions in the mare to assess foetal readiness for birth. **Equine Veterinary Journal**, v.16, p.259-263, 1984.

PALMER, E. Induction of ovulation. In: McKinnon, A.O. & Voss, J.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, p.344-347, 1993.

PANZANI, D.; ROTA, A.; CRISCI, A.; KINDAHL, H.; GOVONI, N.; CAMILLO, F. Embryo quality and transcervical technique are not limiting factors in donkey embryo transfer outcome. **Theriogenology**. v. 77, p.563–569, 2012.

PANZANI, D.; ROTA, A.; MARMORINI, P.; VANNOZZI, I.; CAMILLO, F. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.82, p.807 – 814, 2014.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**. v.44, p.619 – 627, 1995.

PERES, K.R.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; DUARTE, M.C.; MEIRA, C. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology**, v. 57, p. 558-558, 2002.

PINTO, C. R.F.; MEYERS, P.J. Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. In: YOUNGQUIST R.S.; THRELFALL W.R. **Current therapy in large animal theriogenology** St. Louis. Elsevier Science, p. 91-98, 2007.

POLANI, P. E. Pairing of X and Y chromosome, non-inactivation of X- linked genes, and the maleness factor. **Human Genetics**, Heidelberg, v. 60, p. 207-211, 1982.

PYCOCK, J.F. “Artificial Insemination” **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow**, p. 224-234, 2008.

QUINTERO, F.M.; ZARCO, L.Q.; VALENCIA, J.M. Transferencia de embriones híbridos (E. caballus x E. asinus) em mulas. **Veterinaria México**, v. 27, p. 175 – 177, 1996.

RABELO, M.C.; TAVEIROS, A.W.; MELO, P.R.M.; CHAVES, R.M.; SANTOS JUNIOR, E.R.; AGUIAR FILHO, C.R.; BEZERRA, F.Q.G.; ALMEIDA IRMÃO, J.M.; FREITAS NETO, L.M.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Taxas de prenhez e de perda embrionária em éguas da raça Mangalarga Machador em diferentes *status* reprodutivos utilizadas como receptoras em programas de transferência de embriões. **Medicina Veterinária**, v.3, n.4, p.13-19, 2009.

RAMALHO, M. F. P. D-T.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R.; VANTINI, R.; ALVES, B. C. A.; ALMEIDA JUNIOR, I. L.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA FILHO, C. A. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer antisera. **Theriogenology**, v.62, n.2, p.1569-1576, 2004.

RAZ, T.; GREEN, J.; CORRIGAN, M.; CARD, C. Folliculogenesis, embryo parameters, and post-transfer recipient pregnancy rate in eFSH-treated donor mares. In: 52 th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Antonio. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, p. 393-397. 2006.

RAZ, T.; CARLEY, S.; CARD, C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition **Theriogenology**. v.71, p.1358-1366, 2009.

RIERA, F.L. Equine embryo transfer. In: SAMPER J.C. **Equine breeding and management and artificial insemination**. Saunders Company, Pennsylvania. p.229-246, 2000.

RIERA, F.L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 185-199, 2009.

RIBEIRO, E.A. MELLO, M.O. Transferência de Embrião Muar para Mulas Acíclicas (2006). Disponível no site: <http://jumentoemuar.blogspot.com.br/2012/03/transferencia-de-embriao-muar-para.html>

ROMANO, R.M. **Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas**. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROOSDALE, P.D.; RICKETTS, S.W. **Equine Stud Farm Medicine**, Londres, Baillière Tindall, 2<sup>o</sup>ed, p. 564, 1980.

RUFINO, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Determinação do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma revisão de métodos com ênfase para a PCR. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p. 1-7, 2006.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S. SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R. HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p. 487-491, 1988.

SAMPER, J.C. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares, **AAEP Proceedings**, v. 43, p. 189-191, 1997.

SAMPER, J.C.; JENSEN, S.; SERGEANT, J.; ESTRADA, A. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 22, n.7, p. 320-323, 2002.

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Saunders, 2007.

SAMPER, J.C. Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v. 70, p. 445-447, 2008.

SANTOS JUNIOR, E.R.; MELO, A.N.; HOLANDA, G.M.I.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Identificação do sexo em caprinos e ovinos com quantidade reduzida de DNA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 352-356, 2011.

SCHRÖDER, A.; MILLER, J. R.; THOMSEN, P. D.; ROSCHLAU, K.; AVERY, B.; POULSEN, P. H.; SCHMIDT, M.; SCHWERIN, M.; Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology**, v.1, n.2, p.121-133, 1990.

SEIDEL JR, G.E.; CULLINGFORD, E.L.; STOKES, J.E.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M. Pregnancy rates following transfer of biopsied and/or vitrified equine embryos: Evaluation of two biopsy techniques. **Animal Reproduction Science**. v.121S, p. 297 – 298, 2010.

SHARP, D.C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.679-689, 2000.

SHORT, R.V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: WOLSTENHOLME, G.E.W; O'CONNOR, M. (Ed). **Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy**. London: Churchill, p.2-26, 1969.

SHORT, R. V. Sex determination and differentiation. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals: embryonic and fetal development**. 2° ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 70-113, 1982.

SIEME, H.; SCHAFFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1153–64, 2003.

SILVA, L. A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; JACOB, J.C.F.; REIS, C.P.; GINTHER, O. J. A New Alternative for Embryo Transfer and Artificial Insemination in Mares: Ultrasound-Guided Intrauterine Injection. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n.8, p. 324-332, 2004.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biological Reproduction**, v.72, p.755-761, 2005.

SILVA, P.C.A. **Avaliação de Parâmetros Reprodutivos com o uso de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e Deslorelina em um Programa de Transferência de Embrião Equino**. 2011. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

SILVEIRA, L.L.; SOUZA, R.V.; MELO, N.S.S.; PEZZINI, T.G.; McMANUS, C.; RUMPF, R. A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 412 – 416, 2005.

SINCLAIR, A. H.;BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, W. J.; FRISCHAUF, A. M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Natures**, London, v.346, p. 240-244, 1990.

SLADE, N.P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E.L.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL Jr, G.E. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, v.24, n. 1, p. 45-58, 1985.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryo. **Animal Reproduction and biotechnology laboratory**. Colorado State University, Bulletin 8, 1995.

SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51(1), 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.

SOUZA, F.A.C.S. **Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões**. 2006. 85p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

STANTON, M.B.; STEINER, J.B.; PUGH, D.G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 1, p. 14-9, 2004.

STOUT, T.A.; ALLEN, W.R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, v.121, p.771-775, 2001.

STOUT, T.A.E; SALLY MEADOWS; ALLEN, W.R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**. v. 87, p. 269 – 281, 2005.

STOUT, T.A.E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 5, p. 467-78, 2006.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 210 – 216, 2012.

TADIR, Y.; WRIGHT, W.H.; VAFA, O.; ORD, T.; ASCH, R.; BERNS, M.W. Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap. **Fertility and Sterility**. v. 52, p. 870-873, 1989.

TADIR, Y.; WRIGHT, W.H.; VAFA, O.; ORD, T.; ASCH, R.; BERNS, M.W. Force generated by human sperm correlated to velocity and determined using a laser trap. **Fertility and Sterility**.v. 53, p. 944- 947, 1990.

TAYLOR, M. J.; SHORT, R. V. Development of the germ cells in the ovary of the mule and hinny. **Journal Reproductive Fertility**, v. 32, p. 441 – 445, 1973.

THEIMANN, A.K.; BELL, N.J. The Peculiarities of Donkey Respiratory Disease. In: LEKEUX, P. **Equine Respiratory Diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001.

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

VANDERWALL, D. K. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: BALL, B.A. (Ed.) **Recent Advances in Equine Theriogenology**. International Veterinary Information Service. Disponível na Internet <http://www.ivis.org>, 2000.

VANDERWALL, D.K. Embryo collection, storage and transfer. In: RONBINSON, N. E. **Current therapy in equine medicine**. Philadelphia: Saunders, p. 280-285, 2003.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: YOUNGQUIST, R.S.; THRELFALL, R.W., **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2<sup>o</sup> edição. St Louis: Saunders; p. 211–218, 2007.

VAN VLIET, R.A.; VERRINDER GIBBINS, A.M.; WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: A review of current methods with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.32, n.1, p.421-438, 1989.

VENDRAMINI, O.M.; BRUYAS, J.F.; FIENI, F.; BATTUT. I.; TAINTURIER, D. Embryo transfer in Poitou donkeys, preliminary results. **Theriogenology**, v. 47, p.409, 1997.

VERONESI, M.C.; BATTOCHIO, M.; FAUSTINI, M.; GANDINI, M.; CAIROLI, F. Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the Thoroughbred mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 25, p. 133-140, 2003.

VIEIRA, D.P. “Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações”. 2002. Disponível em <<http://www.imt.usp.br/portal/stories/dmdocuments/aula2.pdf>>. Acessado em 10 de setembro de 2015.

WACHTEL, S.S.; H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.19-28, 1984.

WILBORN, R.; PUGH, D.G. Donkey Reproduction In: Equine Reproduction, Second Edition. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner c\_ Blackwell Publishing Ltd, 2011. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 2011.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 38; n. 5; p. 428-32, 2006.

WILSON, C.G.; DOWNIE, C.R.; HUGHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeatedhCG injections on reproductive efficiency in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.10, n.4, p.301-308, 1990.

WODSEDALEK, J. E. Causes of sterility in the mule. **Biological Bulletin**, n.1, 57 p, 1916.

ZON, E.; FAN, G. The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. **Heredity**, v. 62, p. 393-406, 1989.